



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: «Μελέτη της επίδρασης του *Crocus Sativus* L. (σαφράν) στη λειτουργικότητα του ενζύμου CYP1A2 σε υγιείς εθελοντές»

Νικόλαος Γκόβαρης

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ευτυχία Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Ανοσολογίας
- Ανδρέας Τσακάλωφ, Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Φαρμακολογία

Λάρισα, Οκτώβριος, 2018



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



**MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

MASTER THESIS

**Effects of *Crocus Sativus* L. (saffron) on the activity of CYP1A2 in
healthy volunteers**

**By
Nikolaos Govaris**

Three-member Supervisory Committee:

- Eftihia Asproдини, Associate Professor of Pharmacology (Supervisor)
- Anastasios Germanis, Professor of Immunology
- Andreas Tsakalof, Associate Professor of Chemistry

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in
partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Pharmacology

Larisa, October, 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Συστατικά του Κρόκου.....	9
1.2 Βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών του Κρόκου Κοζάνης	12
1.3 Δράσεις των συστατικών του Κρόκου Κοζάνης	13
1.4 Κυτόχρωμα P450.....	16
1.5 CYP1A2	17
1.6 Επίδραση φυσικών προϊόντων στα ένζυμα μεταβολισμού των ξενοβιοτικών	19
1.7 Καφεΐνη-μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης.....	19
1.8 Σκοπός.....	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
2.1 Εθελοντές και πειραματικό πρωτόκολλο	24
2.2 Αναλυτική μέθοδος	28
2.2.1 Αντιδραστήρια και χημικές ουσίες.....	28
2.2.2 Συσκευές χρωματογραφίας.....	28
2.2.3 Χρωματογραφικές συνθήκες.....	29
2.3 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων	29
2.3.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων των μεταβολιτών της 137X στα ούρα.	29
2.3.2 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων 137X, 17X και 37X στο σίελο.....	30
2.4 Επεξεργασία δειγμάτων ούρων	30
2.5 Επεξεργασία δειγμάτων σιέλου.....	31
2.6 Ποιοτικός έλεγχος	31
2.6.1 Γραμμικότητα καμπυλών βαθμονόμησης των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα.	31
2.6.2 Γραμμικότητα καμπύλης βαθμονόμησης της καφεΐνης και των μεταβολιτών της στο σίελο.	31
2.7 Ακρίβεια και επαναληψιμότητα	32
2.8 Στατιστική ανάλυση	34
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	35
3.1 CYP1A2	35
3.1.1 Δείγματα ούρων 0-5h	40
3.1.2 Δείγματα ούρων 6h.....	40
3.1.3 Δείγματα σιέλου (17X/137X).....	43
3.1.4 Δείγματα σιέλου (37X/137X).....	43
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
4.1 CYP1A2	46

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	51
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	52

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, κ. Ασπροδίνη Ευτυχία, ως Επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, τον κύριο Γερμενή Αναστάσιο Καθηγητή Ανοσολογίας και τον κύριο Τσακάλωφ Ανδρέα Αναπληρωτή Καθηγητή Χημείας, ως μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ηλία Μπέγα, ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συνεχή καθοδήγηση καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας και του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Τέλος, ιδιαίτερη μνεία οφείλεται στους γονείς μου, την αδελφή μου Σοφία και τους εθελοντές που συμμετείχαν στην διπλωματική εργασία, καθώς η συμβολή τους αποδείχθηκε καθοριστική.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Ο Κρόκος ή σαφράν (*Crocus Sativus* L.) είναι ένα φυτό γνωστό από την αρχαιότητα με χρήση στη μαγειρική, στη βαφή ενδυμάτων και στην παραδοσιακή ιατρική. Τα ξηρά κόκκινα στίγματα χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της κατάθλιψης, ενώ παρουσιάζουν και αντιοξειδωτική δράση. Σε *in vivo* μελέτες δείχθηκε η επίδραση διαφόρων βοτάνων στη δραστηριότητα ενζύμων της Φάσης I και II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών. Δεν υπάρχει, όμως, αντίστοιχη *in vivo* έρευνα για την επιρροή του Κρόκου στη λειτουργία των συγκεκριμένων ενζύμων. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η *in vivo* διερεύνηση της επίδρασης του τσαγιού του Κρόκου Κοζάνης στη λειτουργικότητα του ενζύμου CYP1A2 και στη μεταβολική οδό καφεΐνης-θεοβρωμίνης σε υγιείς εθελοντές.

Μέθοδοι: Στη μελέτη συμμετείχαν εννέα εθελοντές που απείχαν από φάρμακα και τροφές που επηρεάζουν τη λειτουργία του CYP1A2 για 14 μέρες, στις έξι εκ των οποίων κατανάλωσαν 300mg στιγμάτων Κρόκου Κοζάνης ημερησίως με τη μορφή τσαγιού. Η καφεΐνη χρησιμοποιήθηκε ως φάρμακο-δείκτης της δραστηριότητας του CYP1A2. Δείγματα ούρων και σιέλου συλλέχθηκαν σε τρεις φάσεις διαίτας: *φάση I*: ελεύθερη διαίτα, *φάση II*: ελεγχόμενη διαίτα και *φάση III*: ελεγχόμενη διαίτα με καθημερινή κατανάλωση Κρόκου. Οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών της καφεΐνης στο σίελο και στα ούρα υπολογίσθηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Η δραστηριότητα του CYP1A2 προσδιορίστηκε μέσω των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα και στο σίελο.

Αποτελέσματα: Οι μέσες τιμές του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για το CYP1A2 στα ούρα συλλογής 0-5 ωρών παρουσίασαν μη στατιστικώς σημαντική μείωση για τις τρεις φάσεις της μελέτης (*φάση I*: $4,97 \pm 0,82$, *φάση II*: $4,64 \pm 0,75$, *φάση III*: $4,06 \pm 0,83$; $p > 0,05$). Οι αντίστοιχες τιμές για τη μεμονωμένη συλλογή ούρων (6^η ώρα) παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική μείωση μετά την κατανάλωση του Κρόκου (*φάση I*: $5,01 \pm 1,22$, *φάση II*: $4,65 \pm 0,86$, *φάση III*: $4,08 \pm 0,92$; $p = 0,008$). Ο δείκτης στο σίελο παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μείωση μετά την κατανάλωση του Κρόκου (*φάση I*: $0,77 \pm 0,37$, *φάση II*: $0,68 \pm 0,18$, *φάση III*: $0,52 \pm 0,15$; $p < 0,001$). Δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στον μεταβολικό λόγο της θεοβρωμίνης (*φάση I*: $0,84 \pm 0,62$, *φάση II*: $0,52 \pm 0,48$, *φάση III*: $0,55 \pm 0,25$; $p > 0,05$).

Συμπέρασμα: Η τακτική κατανάλωση τσαγιού Κρόκου Κοζάνης μειώνει τη δραστηριότητα του CYP1A2, ενώ δεν επηρεάζει την μεταβολική οδό της θεοβρωμίνης. Η αναστολή αυτή είναι πιθανόν να επηρεάζει τη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική φαρμάκων που είναι υποστρώματα του CYP1A2 και μπορεί να ασκεί χημειοπροστατευτική δράση σε άτομα που εκτίθενται σε περιβαλλοντικά προκαρκινογόνα.

Λέξεις κλειδιά: CYP1A2, Κρόκος Κοζάνης, ξενοβιοτικά, καφεΐνη.

ABSTRACT

Introduction: Saffron (*Crocus Sativus* L.), is known from the ancient times and has been used in cooking, as a dying agent and in traditional medicine. Saffron red dry stigmas are used for the treatment of depression and they act as antioxidants. Previous *in vivo* studies have shown that various herbs affect the activity of Phase I and II of xenobiotic metabolism enzymes. However, the effect of saffron on the activity of these enzymes has not been explored. The purpose of the present study was to determine the effect of saffron tea (Krokos Kozanis, Greece) intake on the activity of CYP1A2 and the metabolic pathway of caffeine-theobromine in healthy volunteers.

Methods: Nine volunteers participated in this study. The volunteers abstained for 14 days from drugs and foods that are known to affect the activity of CYP1A2. On days 8th-13th, the volunteers consumed a 300mg saffron tea daily. Caffeine was used as probe-drug for CYP1A2 activity. Urine and saliva samples were collected in three phases of diet: *phase I*: free diet, *phase II*: restricted diet and *phase III*: consumption of saffron tea under restricted diet. The concentrations of caffeine metabolites in urine and saliva were estimated via High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The activity of CYP1A2 was measured through caffeine metabolic ratios in urine and saliva.

Results: The mean values of caffeine metabolic ratios for CYP1A2 in urine samples obtained at 0-5 hours exhibited a non-statistically significant reduction among the three phases (4.97 ± 0.82 , 4.64 ± 0.75 , 4.06 ± 0.83 , $p > 0.05$). The metabolic ratio values for the urine spot samples (6th hour) were significantly reduced following saffron tea consumption (5.01 ± 1.22 , 4.65 ± 0.86 , 4.08 ± 0.92 , $p = 0.008$). Similarly, the metabolic ratios in saliva samples were significantly reduced following tea consumption (0.77 ± 0.37 , 0.68 ± 0.18 , 0.52 ± 0.15 , $p < 0.001$). No statistically significant alteration of the activity of the metabolic pathway of theobromine was observed (0.84 ± 0.62 , 0.52 ± 0.48 , 0.55 ± 0.25 and $p > 0.05$).

Conclusion: Regular consumption of saffron tea reduces CYP1A2 activity, while the metabolic pathway of theobromine is not influenced. It is suggested that the observed CYP1A2 inhibition may influence the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs which are substrates of CYP1A2 and could be chemoprotective for individuals exposed to environmental procarcinogens.

Key words: CYP1A2, saffron, caffeine, xenobiotics.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από τα αρχαία χρόνια έως και σήμερα οι άνθρωποι συνηθίζουν να καλύπτουν πρωταρχικές ανάγκες της υγείας τους βασιζόμενοι σε παραδοσιακές θεραπείες, όπως η χρήση φυτικών εκχυλισμάτων, κυρίως με τη μορφή υδατικών διαλυμάτων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εντοπίζεται σε θεραπείες με βότανα, μιας και μέχρι και σήμερα σε Ευρώπη και Ασία συνταγογραφούνται αφεψήματα βοτάνων. Παρ'όλ'αυτά, για τέτοιες εφαρμογές δεν υπάρχουν ακόμη μελέτες που να τεκμηριώνουν πλήρως την εγκυρότητα τους. Γι'αυτό το λόγο βασίζονται κυρίως στην παραδοσιακή ιατρική. Ο Κρόκος (*Crocus Sativus* L.), τον οποίο μελετούμε στην τρέχουσα έρευνα, μπορεί να καταναλωθεί με τη μορφή τσαγιού.

Ο Κρόκος (*Crocus Sativus* L.), γνωστός και ως σαφράν, είναι ένα αιωνόβιο φυτό το οποίο ευδοκίμει σε χώρες, όπως το Ιράν και η Ινδία, αλλά και σε μεσογειακές χώρες, όπως η Ελλάδα. Η δρόγη του φυτού προέρχεται από τα ξηρά κόκκινα στίγματα του άνθους του Κρόκου, τα οποία διατίθενται και στο εμπόριο (Zargari, 1990). Το φυτό ανθίζει τον Οκτώβρη, ενώ η συλλογή των άνθεων διαρκεί τρεις με τέσσερις εβδομάδες μεταξύ Οκτωβρίου και Νοεμβρίου. Ο Κρόκος προτιμά αμμώδη και εύφορα εδάφη, τα οποία προτιμάται να είναι καλά στραγγιζόμενα. Δεν απαιτεί εδάφη ιδιαίτερα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά. Κατατάσσεται στο βασίλειο των φυτών, στην συνομοταξία μανωλιόφυτα, στην κλάση μονοκοτυλήδονα, στην τάξη Λειριώδη και στην οικογένεια των Ιριδοειδών. Σήμερα, η περιοχή όπου γίνεται μεγάλη παραγωγή του κρόκου είναι ο νομός Κοζάνης στην Ελλάδα, ενώ καλλιεργείται στην Ισπανία και στο Μαρόκο (Χρυσοστομίδου, 2012).

Όσον αφορά την χρησιμότητα του Κρόκου, υπάρχουν σχετικές αναφορές από τα αρχαία χρόνια. Σε μια από αυτές αναφέρεται ότι χρησιμοποιούνταν για τη βαφή των υφασμάτων από τους αρχαίους Έλληνες και τους Ρωμαίους (Χρυσοστομίδου, 2012). Ειδική μνεία γίνεται από τον Ιπποκράτη για τις ιαματικές και αφροδισιακές ιδιότητες του φυτού (Χρυσοστομίδου, 2012). Ανέκαθεν, βέβαια, χρησιμοποιείται ως καρύκευμα στη μαγειρική (Samuelsson, 2004). Υπάρχει ακόμη αναφορά για τον Κρόκο στην αρχαία Ελληνική μυθολογία. Σύμφωνα με το μύθο, ενώ ο θεός Ερμής εξασκούνταν στη δισκοβολία, χτύπησε θανάσιμα τον Κρόκο. Έτσι αποφάσισε να μετατρέψει το κορμί του σε μοβ λουλούδι και το αίμα του Κρόκου σε τρία κόκκινα στίγματα, το οποίο ανθίζει κάθε φθινόπωρο στη γη της Κοζάνης (Χρυσοστομίδου, 2012).

Στην παραδοσιακή ιατρική, ο Κρόκος χρησιμοποιείται ως αντικαταθλιπτικό, αποχρεμπτικό, αντι-ασθματικό και εμμηναγωγό φάρμακο, ενώ σε άλλες περιπτώσεις έχει χρησιμοποιηθεί ως αντισπασμωδικός, αφροδισιακός και τονωτικός παράγοντας (Schmidt *et al.*, 2007, Nemat *et al.*, 2008). Σε μελέτες σε ανθρώπους, έχει δειχθεί η δράση του Κρόκου ως αντικαταθλιπτικό, καθώς είχε καλύτερη δράση από placebo, ενώ η απόδοσή του ήταν ισάξια με ορισμένες δόσεις ιμιπραμίνης ή φλουοξετίνης. Πιθανή θεωρείται, ακόμη, η ευεργετική του δράση έναντι της

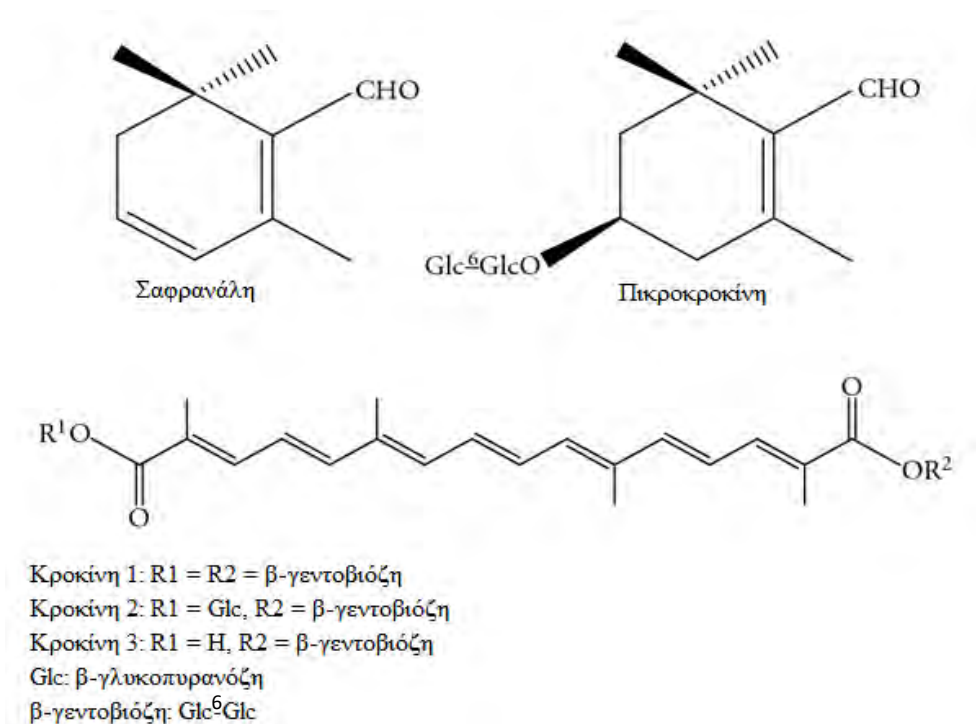
σχιζοφρένειας (Sarris, 2007, Trachil *et al.*, 2007, Pitsikas, 2016). Επιπλέον, ο Κρόκος έχει αντιοξειδωτική δράση προστατεύοντας τα αιμοπετάλια και ταυτόχρονα σταματά την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Chatterjee *et al.*, 2005). Σε *in vitro* μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα αλλά και *in vivo* σε ζώα έχει δειχθεί η αντικαρκινική δράση του Κρόκου (Samargardhian and Borgji, 2014). Σε μελέτες σε ποντίκια, βρέθηκε ότι έχει αντιπυρετική, αντιφλεγμονώδη, αντιυπερτασική, αντισπασμωδική, αντιβηχική και αφροδισιακή δράση, ενώ σε αρουραίους ενίσχυε τη μνήμη και την ικανότητα μάθησης (Hosseinzadeh *et al.*, 2002, Abe and Siato, 2000, Fatehi *et al.*, 2003, Hosseinzadeh and Talebzadeh, 2005, Hosseinzadeh and Ghenaati, 2006, Hosseinzadeh *et al.*, 2008). Έχει παρατηρηθεί, ακόμη, η συνέργεια Κρόκου και οπιοειδών για την αναλγητική δράση των τελευταίων σε ποντικούς, ενώ σε άλλη μελέτη γίνεται λόγος για καρδιοπροστατευτική δράση του Κρόκου έναντι της τοξικότητας που προκαλείται από την ισοπροτερενόλη (Hosseinzadeh and Jahania, 2010, Goyal *et al.*, 2011).

Ο Κρόκος διαθέτει πάνω από 150 συστατικά, άλλα πτητικά, άλλα μη πτητικά και άλλα αρωματικά (Evans, 1996). Σε αναλύσεις που διεξήχθησαν στα στίγματα του Κρόκου έχουν ανευρεθεί καροτενοειδή (κροκίνη, κροκετίνη), αλλά και τερπένια, όπως η σαφρανάλη και η πικροκροκίνη (Bathaie and Musavi, 2010). Επιπλέον, είναι γνωστή η παρουσία και άλλων καροτενοειδών στο φυτό, όπως η ζεαξανθίνη, το λυκοπένιο, το α- και το β-καροτένιο (Rios *et al.*, 1996). Σε άλλες έρευνες, γίνεται λόγος για εύρεση επιπλέον ενώσεων στο άνθος του Κρόκου Κοζάνης, όπως η καμφερόλη, οι ταννίνες και οι ανθοκυανίνες (Abdullaev and Espinosa-Aguirre, 2004, Tarantilis *et al.*, 1995). Τα συστατικά του Κρόκου που συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι η κροκίνη, η κροκετίνη, η σαφρανάλη και η πικροκροκίνη (**Εικόνα 1**).

1.1 Συστατικά του Κρόκου

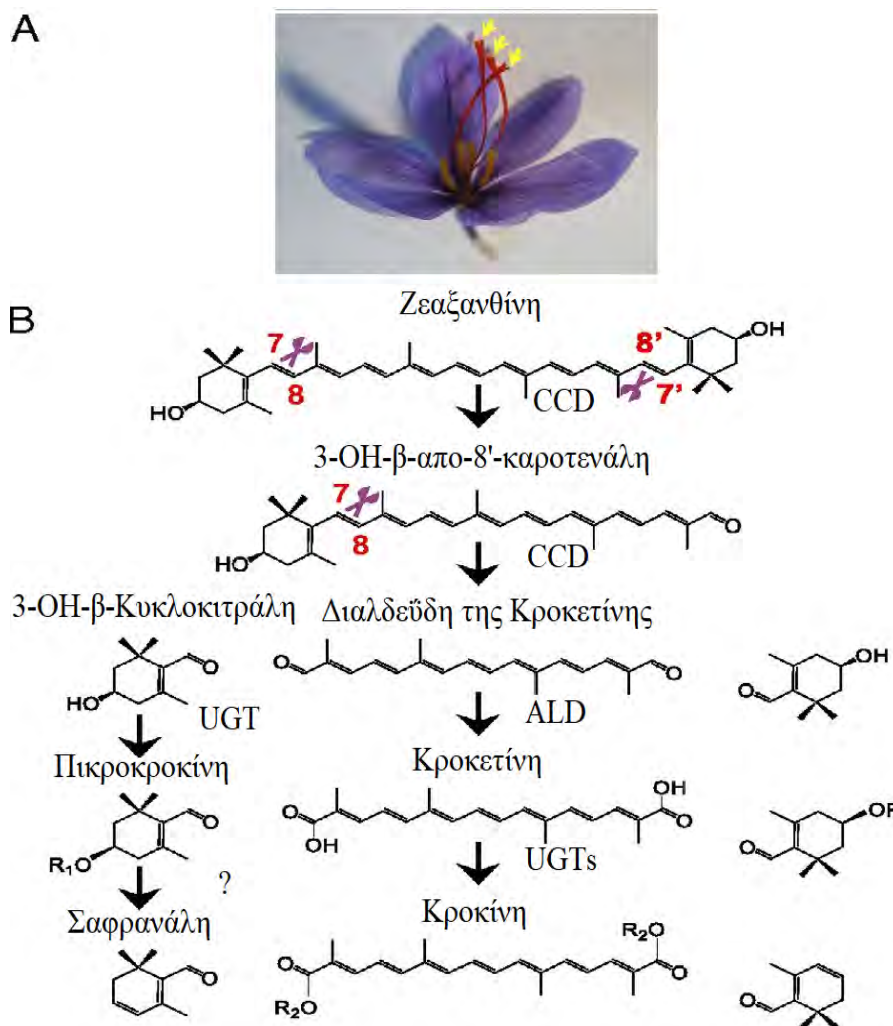
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα συστατικά του υπό μελέτη φυτού που συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι η κροκίνη, η κροκετίνη, η σαφρανάλη και η πικροκροκίνη. Όλες οι προαναφερθείσες ενώσεις ανήκουν στην κατηγορία των τερπενίων. Τα τερπένια είναι ενώσεις που εντοπίζονται σε όλα τα μέρη των ανώτερων φυτών (ρίζες, λουλούδια, σπέρματα, κορμός), σε μύκητες, φύκη, λειχήνες και αποτελούνται από μονάδες ισοπρενίου (C_5H_8). Μερικά γνωστά τερπένια είναι η μενθόλη, η καμφορά και η βιταμίνη-A (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 2009). Η κροκίνη και η κροκετίνη ανήκουν στην κατηγορία των καροτενοειδών. Στα στίγματα του Κρόκου παρατηρούνται οι μονοτερπενικές αλδεϋδες, πικροκροκίνη και σαφρανάλη (Bathaie and Musavi, 2010). Η πικροκροκίνη αποτελεί γλυκοζίτη της σαφρανάλης, έχοντας στη δομή της μια ομάδα γεντοβιόζης. Τα καροτενοειδή είναι τετρατερπένια και έχουν μοριακό τύπο $C_{40}H_{56}$. Είναι ευρύτατα διαδεδομένα στη φύση σε όλους τους φωτοσυνθέτοντες οργανισμούς και είναι

υπεύθυνα κυρίως για τα κίτρινα και κόκκινα χρώματα του φυτικού και ζωικού βασιλείου. Όσον αφορά τη δομή τους, το κεντρικό τμήμα του μορίου των περισσότερων καροτενοειδών αποτελείται από μια συζυγιακή αλυσίδα που περιλαμβάνει τέσσερις ομάδες ισοπρενίου, ενώ τα άκρα της αλυσίδας μπορεί να είναι και τα δύο ανοιχτά, και τα δύο να έχουν δακτύλιο ή το ένα να έχει δακτύλιο και το άλλο να είναι ανοιχτό. Μερικά τερπένια, τα οποία έχουν λιγότερα από 40 άτομα άνθρακα, σχετίζονται δομικά με τα καροτενοειδή και για αυτό το λόγο ονομάζονται αποκαροτενοειδή. Αυτά περιέχουν στο μόριό τους αλδεϋδομάδες, καρβοξυλομάδες ή εστερομάδες. Διεστέρας με γεντοβιόζη του C20 αποκαροτενίου είναι η α-κροκίνη ή κροκίνη 1, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1** (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 2009). Οι κροκίνες προκύπτουν από την εστεροποίηση της κροκετίνης με ομάδες γεντοβιόζης και γλυκόζης και είναι υδροφιλικές ενώσεις (Wallis, 2005, Liakopoulou-Kyriakides and Kyriakides, 2002. Κατά κύριο λόγο στον Κρόκο εμφανίζεται η α-κροκίνη (κροκίνη 1) καθώς λόγω των τμημάτων γεντοβιόζης είναι ιδιαίτερα υδατοδιαλυτή, ενώ στα ξηρά στίγματα βρίσκεται σε ποσοστό άνω του 10%. Μαζί με την κροκετίνη είναι οι ουσίες στις οποίες τα στίγματα του Κρόκου οφείλουν το κόκκινο χρώμα τους (Liakopoulou-Kyriakides and Kyriakides, 2002, Martin *et al.*, 2002). Με υδρόλυση της κροκίνης, παράγονται δύο ομάδες γεντοβιόζης και η κροκετίνη (Wallis, 2005). Η κροκετίνη είναι μία υδρόφοβη ένωση και για αυτό το λόγο διαλύεται πιο εύκολα σε ελαιώδεις φάσεις (Liakopoulou-Kyriakides and Kyriakides, 2002). Κατά κύριο λόγο στο άνθος του Κρόκου παρατηρείται το trans-ισομερές της κροκετίνης, αλλά σε μικρές ποσότητες βρίσκεται και το cis-ισομερές με τους γλυκοζίτες του (Melnyk *et al.*, 2010). Η κροκετίνη αποτελεί σε ποσοστό κατά προσέγγιση το 14% της αποξηραμένης μάζας των σιγμάτων του κρόκου κάτι το οποίο εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης του φυτού και τις μεθόδους κατεργασίας του (Lage and Cantrell, 2009).



Εικόνα 1: Δομές των συστατικών του Κρόκου Κοζάνης και των κροκινών (Frusciante *et al.*, 2014).

Σύμφωνα με στοιχεία άλλων μελετών, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι τα ενεργά συστατικά του Κρόκου (κροκίνη, κροκετίνη, πικροκροκίνη, σαφρανάλη) προέρχονται από τη ζεαξανθίνη (**Εικόνα 2**) (Frusciante *et al.*, 2014). Έτσι, από την ζεαξανθίνη προκύπτουν ένα μόριο κροκετίνης και δύο μόρια πικροκροκίνης, τα οποία δυνητικά μπορούν να οδηγήσουν σε κροκίνη και σαφρανάλη, αντίστοιχα. Η πικροκροκίνη και η σαφρανάλη είναι μονοτερπενικές αλδεϋδες που ανήκουν στην κατηγορία των μονοτερπενίων (Bathaie and Musavi, 2010). Τα μονοτερπένια είναι ενώσεις δέκα ατόμων άνθρακα και οικοδομούνται από δύο ομάδες ισοπρενίου (C₅H₈). Μαζί με τα σесκιτερπένια αποτελούν τα κύρια συστατικά των αιθερίων ελαίων, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως ως καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα. Τα μονοτερπένια, ανάλογα με το χημικό τους τύπο, διακρίνονται σε άκυκλα, μονοκυκλικά και δικυκλικά. Παραδείγματα άκυκλου, μονοκυκλικού και δικυκλικού τερπενίου είναι η β-κιτράλη, η καρβόνη και το α-πινένιο αντίστοιχα (Ραγκούση Ιγνατιάδου, 2009). Η πικροκροκίνη είναι η ουσία που δίνει στον Κρόκο την χαρακτηριστική πικρή γεύση που τον διακρίνει, έχει εντομοκτόνο και παρασιτοκτόνο δράση, ενώ βρίσκεται στην τελική ξηρή μάζα των σιγμάτων του Κρόκου σε ποσοστό άνω του 4% (Evans, 1996). Κατά την ξήρανση των σιγμάτων του Κρόκου και με τη βοήθεια του ενζύμου β-γλυκοσιδάση παράγεται η σαφρανάλη, με αφυδάτωση και απομάκρυνση από το μόριο της πικροκροκίνης ενός μορίου D-γλυκόζης (Alonso *et al.*, 2007). Η σαφρανάλη αποτελεί το 70% του ξηρού πτητικού τμήματος του Κρόκου και είναι υπεύθυνη για το χαρακτηριστικό άρωμα του (Fatehi *et al.*, 2003, Alonso *et al.*, 2007).



Εικόνα 2: Βιοσύνθεση των συστατικών του Κρόκου Κοζάνης από την ζεαξανθίνη (Frusciante *et al.*, 2014).

1.2 Βιοδιαθεσιμότητα των συστατικών του Κρόκου Κοζάνης

Η κροκίνη, η κροκετίνη και η πικροκροκίνη είναι ενώσεις που εμφανίζονται συνήθως αποθηκευμένες στα φρέσκα στίγματα του Κρόκου. Αντιθέτως, η σαφρανάλη δε βρίσκεται στα φρέσκα στίγματα του Κρόκου, αλλά σχηματίζεται από την πικροκροκίνη με αφυδάτωση κατά την ξήρανση και αποθήκευση των σιγμάτων, με τη βοήθεια του ενζύμου β-γλυκοσιδάση (Alonso *et al.*, 2007).

Σύμφωνα με μελέτες, μετά την κατανάλωση τσαγιού Κρόκου, η κροκίνη δεν απορροφάται από τον γαστρεντερικό σωλήνα καθώς υδρολύεται προς κροκετίνη κατά την παραμονή της στο γαστρικό αυλό. Η κροκετίνη, αφού απορροφηθεί από τον εντερικό σωλήνα, βιομετατρέπεται προς μονογλυκουρονίδιο, διγλυκουρονίδιο ή παραμένει ως έχει. Η μέγιστη τιμή της συγκέντρωσης στο πλάσμα επιτυγχάνεται δύο ώρες μετά την από του στόματος λήψη του

τσαγιού, ενώ η απομάκρυνση της κροκετίνης από το πλάσμα επιτυγχάνεται μέσα σε εικοσιτέσσερις ώρες (Chryssanthi *et al.*, 2011). Βρέθηκε, ακόμη, ότι η κροκίνη κατά την είσοδό της στο γαστρεντερικό σωλήνα, ανάγεται προς κροκετίνη και β-γεντοβιόζη κατά μήκος του εντερικού αυλού. Αναλυτικά, συμβαίνει στο δωδεκαδάκτυλο, στο μέσο τμήμα του εντέρου, στον ειλεό και στο κόλον σε ποσοστά 13,01%, 10,11%, 9,95% και 10,45%, αντίστοιχα. Υποστηρίχθηκε λοιπόν ότι η κροκίνη δεν εντοπίζεται στο πλάσμα (Jin *et al.*, 2004). Οι *in vivo* φαρμακολογικές ιδιότητες της κροκίνης εκδηλώνονται κυρίως μέσω της κροκετίνης (Zhang *et al.*, 2012). Εξ' αιτίας των χαμηλών επιπέδων σύνδεσής της με την αλβουμίνη, η κροκετίνη διανέμεται σε πολλούς ιστούς του σώματος. Έχει τη δυνατότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, φθάνοντας στο κεντρικό νευρικό σύστημα με παθητική διάχυση όπου μπορεί να ασκήσει θεραπευτική δράση έναντι νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Hosseini *et al.*, 2018).

Η μικροκροκίνη έχει πολύ μικρή βιοδιαθεσιμότητα, κυρίως εξ' αιτίας της ομάδας σακχάρου που περιέχει (Kyriakoudi *et al.*, 2015). Η απορρόφησή της τελικά αυξάνεται μετά από αλληλεπίδραση με τη μικροχλωρίδα και τα πεπτικά ένζυμα του γαστρεντερικού κατά την οποία μετατρέπεται σε σαφρανάλη, την άγλυκη μορφή της (Marin *et al.*, 2015). Πράγματι, μετά από χορήγηση αποστάγματος Κρόκου Κοζάνης από του στόματος σε χοίρους και ποντικούς παρατηρήθηκε υποχώρηση της φλεγμονής του πνεύμονα και του τοξικού, έναντι γονιδίων, στρες, γεγονός που επιβεβαιώνει, έμμεσα, την απορρόφηση της σαφρανάλης στο αίμα (Boskabaly *et al.*, 2012, Koul and Abraham, 2017).

1.3 Δράσεις των συστατικών του Κρόκου Κοζάνης

Όσον αφορά το μηχανισμό δράσης των συστατικών του Κρόκου, έχουν ήδη πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες που περιγράφουν μερικές από τις δράσεις τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Παρ' όλ' αυτά, κρίνεται αναγκαία η διεξαγωγή επιπλέον ερευνών, προκειμένου να διευκρινιστεί επακριβώς η δράση των συστατικών του Κρόκου στον άνθρωπο.

Αντιφλεγμονώδης δράση

Αναφορικά με τα δεδομένα που υπάρχουν, μετά από σχετική *in vitro* μελέτη έγινε γνωστό ότι η κροκίνη αναστέλλει τη δράση της κυκλοξυγενάσης 1 και 2 (COX 1 και COX 2) και έτσι συμμετέχει στην υποχώρηση της φλεγμονής (Xu *et al.*, 2009). Ακόμη, σε ποντικούς, μειώνοντας τη δράση των προφλεγμονωδών κυτοκινών και λειτουργώντας αντιοξειδωτικά, απαλύνει τον νευροπαθητικό πόνο (Abnous *et al.*, 2014).

Δράση κατά της σχιζοφρένειας

Σε αναζήτηση νέων θεραπευτικών μέσων για την αντιμετώπιση της σχιζοφρένειας, ερευνητές διαπίστωσαν ότι ο Κρόκος συνεισφέρει στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της ασθένειας (Georgiadou *et al.*, 2014). Παρόλο που δεν έχει διευκρινισθεί ακόμη ο ακριβής μηχανισμός δράσης, έχουν προταθεί δύο εκδοχές. Στην πρώτη εκδοχή, μετά από μελέτη σε ιππόκαμπο εγκεφάλου ποντικών, δείχθηκε ότι η συστηματική χορήγηση σαφρανάλης μειώνει την επαγόμενη από το καινικό οξύ εξωκυττάρια συγκέντρωση του γλουταμινικού, η οποία έχει βρεθεί ότι είναι υψηλή σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (Hosseinzadeh *et al.*, 2008). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι το απόσταγμα του Κρόκου εμποδίζει τη γλουταμινεργική συναπτική μετάδοση μηνυμάτων στο φλοιό του εγκεφάλου των ποντικών (Berger *et al.*, 2011). Στη δεύτερη εκδοχή, η συνεισφορά του Κρόκου αποδίδεται στην αντιοξειδωτική του δράση. Έχει προταθεί ότι το οξειδωτικό στρες είναι από τους παράγοντες που συμβάλλουν στην εκδήλωση της σχιζοφρένειας και έτσι η αντιοξειδωτική δράση της κροκίνης θα μπορούσε να θεωρηθεί ανασταλτικός παράγοντας για την εμφάνιση της ασθένειας (Ghadroost *et al.*, 2011, Bitanhirwe and Woo, 2011). Ο συγκεκριμένος μηχανισμός δράσης του Κρόκου έχει μελετηθεί σε ζώα με σχιζοφρένεια όπου έχει παρατηρηθεί ότι με την ανταγωνιστική δράση του Κρόκου έναντι της κεταμίνης, αποφεύγεται η λιπιδική υπεροξείδωση, η οξείδωση πρωτεϊνών και η μείωση της ενζυμικής άμυνας του οργανισμού, μειώνοντας έτσι την οξειδωτική βλάβη (de Oliveira *et al.*, 2009, Hosseinzadeh and Khorsavan 2002).

Αγχολυτική δράση

Υπό έρευνα βρίσκεται ακόμη ο ακριβής μηχανισμός δράσης του Κρόκου έναντι διαταραχών άγχους. Μία πιθανή εκδοχή είναι ότι αναστέλλει τους NMDA και σ-οπιοειδείς υποδοχείς και τροποποιεί τη λειτουργία του άξονα HPA (hypothalamus-pituitary-adrenal). Έχει βρεθεί ότι, κατά τις διαταραχές άγχους, ενεργοποιείται ο άξονας HPA με αποτέλεσμα την απελευθέρωση κορτικοστερόνης στο αίμα και ότι οι υποδοχείς NMDA και σ- ρυθμίζουν την έκκριση κορτικοστερόνης από τον επινεφριδιακό φλοιό σε ποντίκια (Miller and O'Callaghan, 2002, Iyengar *et al.*, 1990). Σε άλλη έρευνα, διαπιστώθηκε ότι το υδατικό απόσταγμα κροκίνης εμποδίζει την αύξηση της κορτικοστερόνης στο αίμα σε συνθήκες άγχους σε ποντίκια. Προτείνεται έτσι ως πιθανή εξήγηση της αγχολυτικής δράσης του Κρόκου ότι η κροκίνη αλληλεπιδρά με τον άξονα HPA και τους NMDA και σ-υποδοχείς, καταστέλλοντας τις διαταραχές άγχους, κάτι το οποίο φαίνεται από την μείωση της κορτικοστερόνης στο αίμα ποντικών (Halataei *et al.*, 2011, Lechtenberg *et al.*, 2008).

Βελτιωτική δράση στην μνήμη

Σε μελέτες σε ποντικούς, έχει βρεθεί ότι η χορήγηση δόσης Κρόκου 60 mg/kg ενίσχυε σημαντικά τη μνήμη. Η μειωμένη λιπιδική υπεροξειδωση, η αυξημένη αντιοξειδωτική δράση στον εγκέφαλο καθώς και η μείωση της δράσης της κασπάσης-3 είναι οι κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους ο Κρόκος ενισχύει τη μνήμη. Σημειώνεται, τέλος, ότι σε ηλικιωμένα ποντίκια παρατηρήθηκε μειωμένη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) μετά τη χορήγηση Κρόκου, γεγονός που συμβάλλει στην βελτίωση της μνήμης (Papandreou *et al.*, 2011).

Αντικαρκινική δράση

Ιδιαίτερη μνεία, τέλος, γίνεται στην αντικαρκινική δράση των ενεργών συστατικών του Κρόκου, η οποία εκδηλώνεται με πολλούς τρόπους. Κατ'αρχάς, έχει παρατηρηθεί η δράση της σαφρανάλης κατά των μικροσωληνίσκων. Κατά τον πολυμερισμό τους σε καρκινικά κύτταρα, η σαφρανάλη προσδένεται μεταξύ των α και β υπομονάδων της τουμπουλίνης με υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου, προκαλώντας την αποσταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων και εμποδίζοντας την αναπαραγωγή των κυττάρων (Naghshineh *et al.*, 2015). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και για την κροκίνη σε άλλη μελέτη (Jalilani *et al.*, 2013). Επιπρόσθετες έρευνες έδειξαν ότι η κροκετίνη μπορεί να προκαλέσει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων με δύο τρόπους. Πρώτον, η κροκετίνη τροποποιεί την μιτοχονδριακή λειτουργία οδηγώντας στην αύξηση των επιπέδων κυτοχρώματος C, του αποπτωτικού παράγοντα Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) και της προκάσπασης 9. Οι τρεις αυτοί παράγοντες δημιουργούν ένα σύμπλοκο, το αποπτώσωμα, το οποίο οδηγεί στην παραγωγή των κασπασών 3, 6 και 7 που προκαλούν την απόπτωση του κυττάρου (Liu *et al.*, 2014, Samarghandian *et al.*, 2013, He *et al.*, 2014, Soeda *et al.*, 2001). Δεύτερον, η κροκετίνη προσδένεται σε υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, ενεργοποιώντας ένα μονοπάτι που οδηγεί στην παραγωγή της κασπάσης 8. Στη συνέχεια παράγονται οι κασπάσες 3,6,7 που οδηγούν σε απόπτωση (Samarghandian *et al.*, 2013).

Ένας ακόμη μηχανισμός με τον οποίο η κροκίνη δρα αντικαρκινικά είναι η αναστολή της τελομεράσης. Το συγκεκριμένο ένζυμο συμμετέχει στη διατήρηση των τελομερών, τμημάτων δηλαδή DNA στα άκρα των χρωμοσωμάτων που εξασφαλίζουν την επιβίωση και διαίρεση των κυττάρων. Σε έρευνες σε HepG2 κύτταρα, βρέθηκε ότι μετά την χορήγηση κροκίνης, η δράση της τελομεράσης είναι μειωμένη. Ακόμη, σε σύγκριση με κύτταρα που δεν χορηγούνταν κροκίνη, διαπιστώθηκε 60% μείωση της έκφρασης της τελομεράσης (Noureini and Wink, 2012). Έχει δειχθεί, επίσης, σε μελέτες σε σειρές καρκινικών κυττάρων MDA-MB-231, PC-3 και 22rv1, ότι η κροκίνη και η κροκετίνη εμποδίζουν τη διεισδυτικότητα και την ικανότητα

μετάστασης αυτών των κυττάρων, μειώνοντας την έκφραση των μεταλλοπρωτεασών MMP-2 και MMP-9, αλλά και την δράση του uro (urokinase-type plasminogen activator) (Chryssanthi *et al.*, 2011, Chryssanthi *et al.*, 2008, Festuccia *et al.*, 2014). Σε άλλες μελέτες, έχει βρεθεί ότι η κροκίνη σε συγκέντρωση 500μM μειώνει σημαντικά την παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS) μετά από 24 ή 48 ώρες από την λήψη της σε κύτταρα μυελώματος U266B1, οι οποίες εμπλέκονται στην καρκινογένεση (Soszyński and Bartosz, 1997, el Daly, 1998). Η αντιοξειδωτική αυτή δράση της κροκίνης επιτυγχάνεται με την μείωση της έκφρασης ενζύμων που εμπλέκονται στο οξειδωτικό stress, όπως η GST (glutathione S-transferase), η GPx (glutathioneperoxidase) και η SOD (superoxide dismutase) (Mahboobeh *et al.*, 2015, Harvey *et al.*, 2000, Mostafavinia *et al.*, 2016). Τέλος, όπως αναφέρεται σε σχετικές έρευνες, η κροκίνη και η κροκετίνη έχουν τη δυνατότητα να σταματούν τον κυτταρικό κύκλο της αντιγραφής στη φάση S, στα G0/G1 και G2/M στάδια, σταματώντας έτσι τη μίτωση και την αναπαραγωγή του κυττάρου με τελικό αποτέλεσμα την απόπτωση του κυττάρου.

1.4 Κυτόχρωμα P450

Το κυτόχρωμα P450 (CYP450) είναι μια υπεροικογένεια αιμοπρωτεϊνών που αποτελούν το τελευταίο στάδιο της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων προερχόμενα από το NADPH. Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 διεκπεραιώνουν μια σειρά από αντιδράσεις οξείδωσης της φάσης I του μεταβολισμού πολλών δομικώς διαφορετικών υποστρωμάτων, ενώ παράλληλα καταλύουν σημαντικές βιοχημικές εργασίες στα θηλαστικά (Smith *et al.*, 1998). Το CYP450 βρίσκεται στις μεμβράνες του Λείου Ενδοπλασματικού Δικτύου (Λ.Ε.Δ.). Τα υποστρώματά του είναι λιποδιαλυτές ενώσεις και, λόγω της λιποειδικής φύσης των μεμβρανών του Λ.Ε.Δ., το διαπερνούν και παραμένουν εκεί. Αντιδράσεις όπως η μετατροπή της χοληστερόλης σε κορτικοειδή και η βιοσύνθεση των προσταγλανδινών είναι απαραίτητες για την επιβίωση του ανθρώπου και καταλύονται από το κυτόχρωμα P450. Επιπρόσθετα, μελέτες δείχνουν ότι μεταβολίζει αρκετά από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα ενώ εμπλέκεται και στην *in vivo* ενεργοποίηση ισχυρών καρκινογόνων ουσιών (Olson, 1997).

Η μεγάλη αυτή οικογένεια των αιμοπρωτεϊνών κωδικοποιείται από δεκαοχτώ οικογένειες γονιδίων P450 από τις οποίες προέρχονται τα εξήντα, τουλάχιστον, κυτοχρώματα P450 που εκφράζονται στον ανθρώπινο οργανισμό. Το 75-80% του μεταβολισμού της φάσης I και το 65-70% της κάθαρσης των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται πραγματοποιούνται από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450. Έχει βρεθεί από ερευνητές ότι οι τρεις πρώτες οικογένειες του CYP (1-3) συμμετέχουν στο μεταβολισμό εξωγενών υποστρωμάτων, όπως τα φάρμακα. Οι υπόλοιπες

οικογένειες συνεισφέρουν στο μεταβολισμό ενδογενών υποστρωμάτων (Sim and Ingelman-Sundberg, 2010).

Τα ένζυμα CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 είναι τα μέλη της οικογένειας CYP1 του ανθρώπινου κυτοχρώματος και παρουσιάζουν ιστοειδική βασική έκφραση. Οι αλληλουχίες των αμινοξέων του CYP1A1 και του CYP1B1 παρουσιάζουν ομοιότητα 72% ενώ οι αντίστοιχες των CYP1A1 και CYP1A2 40%. Τα τρία αυτά ένζυμα παρουσιάζουν αξιοσημείωτες αλληλεπικαλύψεις στις δράσεις τους, παρόλο που τα CYP1A1 και CYP1A2 εξειδικεύονται περισσότερο σε εξωτερικά υποστρώματα σε σχέση με το CYP1B1. Το CYP1A2 εντοπίζεται μόνο στο ήπαρ, το CYP1A1 στους πνεύμονες, στα νεφρά, στο λάρυγγα, στον πλακούντα και στα λεμφοκύτταρα ενώ το CYP1B1 στα νεφρά, στις ωοθήκες, στον προστάτη και στη μήτρα (Landi *et al.*, 1999).

1.5 CYP1A2

Το CYP1A2 είναι ένα ένζυμο της οικογένειας του κυτοχρώματος P450. Το γονίδιό του τοποθετείται στο χρωμόσωμα 15, μαζί με τα γονίδια των ενζύμων CYP1A1 και CYP1B1, ενώ διαθέτει επτά εξώνια και έξι ιντρόνια (Zhu *et al.*, 2009). Ένα τμήμα 23kb της 5' πλευρικής περιοχής του γονιδίου του CYP1A2 διαθέτει ρυθμιστικά στοιχεία για την έκφραση του γονιδίου, ενώ αξιοσημείωτο θεωρείται το γεγονός ότι η ίδια περιοχή χρησιμοποιείται και για την έκφραση του γονιδίου CYP1A1 και άλλων γονιδίων (Wang and Zhou, 2009). Αξίζει ακόμη να σημειώσουμε ότι το πρώτο εξώνιο του γονιδίου που έχει μήκος 55 ζεύγη βάσεων δεν κωδικοποιείται (Nelson *et al.*, 2004). Το CYP1A2 δραστηριοποιείται στη φάση I του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών.

Το γονίδιο του CYP1A2 επάγεται από τη δράση μιας κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) που δρα ως υποδοχέας. Μόλις προσδεθεί στον AhR το κατάλληλο μόριο επαγωγέας, το σύμπλοκο πρωτεΐνης επαγωγέα σχηματίζει ετεροδιμερές με την πρωτεΐνη Arnt (AhR nuclear translocator) κι εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου. Το ετεροδιμερές αλληλοεπιδρά με την αλληλουχία 5'-GCGTG-3' της ανταποκρινόμενης σε ξενοβιοτικά περιοχής του DNA (XRE), η οποία με τη σειρά της ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων ενζύμων, δηλαδή των CYP1A1, CYP1B1, CYP1A2, CYP2S1, UGT1A1, UGT1A6 (Carver and Bradfield, 1997, Yueh *et al.*, 2003).

Η επαγωγή του CYP1A2 ενδέχεται να επιφέρει τη μείωση των φαρμακολογικών δράσεων, που προκαλείται από αυξημένο μεταβολισμό των φαρμάκων, ή την ανεπιθύμητη ανισορροπία μεταξύ τοξικότητας και αποτοξίνωσης. Σημειώνεται πως δεν έχει ακόμη αποσαφηνισθεί αν η ενεργοποίηση της οδού του υποδοχέα AhR συμμετέχει στην αύξηση του κινδύνου από την

ενεργοποίηση των προκαρκινογόνων ή βοηθά τον οργανισμό συμβάλλοντας στην ταχεία αποβολή επικίνδυνων χημικών ουσιών (Lin and Lu, 1998).

Σχετικά, με τη δράση του CYP1A2, επισημαίνεται ότι ενεργοποιεί ένα σύνολο προκαρκινογόνων όπως πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (π.χ. βενζοπυρένιο), ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες (προερχόμενες και από το κάπνισμα) ή αμίδια, μυκοτοξίνες (π.χ. αφλατοξίνη B1), αλλά και φυσικά προϊόντα όπως τα αριστοχολικά οξέα. Ακόμη, το ένζυμο μεταβολίζει και ενδογενείς ενώσεις όπως ρετινόλες, μελατονίνη, στεροειδή, ουροπορφυρινογόνο και αραχιδονικά οξέα (Wang and Zhou, 2009, Zhou *et al.*, 2009). Επιπροσθέτως, έχει παρατηρηθεί ότι το CYP1A2 εμπλέκεται στο μεταβολισμό πολλών φαρμάκων. Ως φάρμακο δείκτης για την ενεργότητα του CYP1A2 χρησιμοποιείται ευρέως η καφεΐνη, ενώ σε μικρότερη κλίμακα χρησιμοποιούνται η θεοφυλλίνη, η μελατονίνη και η φαινακετίνη (Gunes, 2008). Φάρμακα που μεταβολίζονται σε ποσοστό άνω του 30% από το CYP1A2 είναι η κλοζαπίνη, η ροπιβακαΐνη, η ολανζαπίνη, η τιζανιδίνη, η τακρίνη, η ζολμιτριπτάνη, η προπρανολόλη, η δουλοξετίνη, η λεφλουνομίδα, η προμαζίνη, η βεραπαμίλη, η ροπινιρόλη, η ναμπουμετόνη και η ριλουζόλη. Σε μικρότερο ποσοστό (10-30%) μεταβολίζονται φάρμακα όπως η μεξιλετίνη, η φλουταμίδα, η λιδοκαΐνη, η ημιπραμίνη, η παραξανθίνη, η προπαφαινόνη, η R-βαρφαρίνη και η R-ακενοκουμαρόλη (Rendic, 2002).

Όσον αφορά τη δραστηριότητα του ενζύμου, κατόπιν ερευνών διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν παράγοντες που επάγουν ή αναστέλλουν τη δραστηριότητά του. Το κάπνισμα, η διατροφή με σταυρανθή λαχανικά καθώς και η κατανάλωση ψημένου κρέατος που συνεπάγεται από έκθεση σε πολυαμινικούς υδρογονάνθρακες αυξάνουν τη δραστηριότητα του CYP1A2 (Gunes, 2008). Η λειτουργία του ενζύμου είναι δυνατόν να αυξηθεί ή να μειωθεί από ουσίες που δρουν ως επαγωγείς ή ως αναστολείς αντίστοιχα. Φάρμακα επαγωγείς του CYP1A2 θεωρούνται οι ομεπραζόλη, λανσοπραζόλη, πριμακίνη, αλμπενδαζόλη (Yoshinari *et al.*, 2008), φαινυντοΐνη, ριφαμπικίνη (Polasek and Frank, 2011), καρβαμαζεπίνη, φαινοβαρβιτάλη και το βαλπροϊκό οξύ (Ogu *et al.*, 2000). Αντιθέτως, φάρμακα αναστολείς της δράσης του CYP1A2 θεωρούνται οι φλουβοξαμίνη, σιπροφλοξασίνη, σιμετιδίνη, διλτιαζέμη, ερυθρομυκίνη, μεξιλετίνη, προπρανολόλη, τικλοπιδίνη, βεραπαμίλη, κλαριθρομυκίνη (Polasek and Frank, 2011), οφλοξασίνη, ενοξασίνη, σιταλοπράμη, τακρίνη, (Ogu *et al.*, 2000). Τέλος, η λειτουργία του CYP1A2 αναστέλλεται από τον χυμό του γκρέϊπ-φρούτ (Fuhr and Kummert, 1995), το αλκοόλ (Le Marchand *et al.*, 1997) και τα αντισυλληπτικά (Gunes, 2008).

Η δραστηριότητα του CYP1A2 διαφέρει μεταξύ των ατόμων, δεν έχει, όμως, συσχετισθεί ακόμη ο γονότυπος του ανθρώπινου CYP1A2 με τον μεταβολικό φαινότυπο του ενζύμου αυτού (Jiang *et al.*, 2006). Αν και έχουν περιγραφεί περισσότερα από 41 σημεία πολυμορφισμού του γονιδίου στον άνθρωπο (Browning *et al.*, 2010), δεν έχει εντοπισθεί η διαφορά νουκλεοτιδίων

που θα εξηγούσε τη φαινοτυπική ποικιλομορφία στο γονίδιο του CYP1A2, ούτε σε εξώνια, ούτε στην περιοχή σύνδεσης εξωνίων-ιντρονίων, ούτε στην 5'-πλευρική περιοχή του γονιδίου σε Καυκάσιους και Ασιατικούς πληθυσμούς (Nakajima *et al.*, 1994, Sachse *et al.*, 2003). Παρ'όλ'αυτά, έχουν περιγραφεί δύο σημειακές μεταλλάξεις στο ιντρόνιο-1 και μία μετάλλαξη στην 5'-πλευρική περιοχή του γονιδίου του CYP1A2. Οι μεταλλάξεις που αναφέρονται αφορούν αυξημένη ή μειωμένη δυνατότητα επαγωγής του CYP1A2 από επαγωγικούς ή ανασταλτικούς παράγοντες, αντίστοιχα (Nakajima *et al.*, 1999; Sachse *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2002).

Επιδημιολογικά, η αυξημένη λειτουργία του CYP1A2 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Tao *et al.*, 2012), του παχέος εντέρου (Lang *et al.*, 1994), ενώ η μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο του καρκίνου των όρχεων (Vistisen *et al.*, 2004).

1.6 Επίδραση φυσικών προϊόντων στα ένζυμα μεταβολισμού των ξενοβιοτικών

Κατά το παρελθόν, έλαβαν χώρα πολλές *in vivo* μελέτες σε ανθρώπους και πειραματόζωα με σκοπό τη διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο επιδρούν τα φυσικά στη λειτουργία του CYP1A2. Αναλυτικά, έχει μελετηθεί η επίδραση της νεραντζιάς (*citrus aurantium*), της εχινάκειας (*Echinacea purpurea*), του σάο παλμέντο (*saw palmento*) και του γαιδουράγκαθου (*milk thistle*) σε ένζυμα του CYP450 σε ανθρώπους (Gurley *et al.*, 2004). Ακόμη, αντίστοιχες έρευνες έχουν γίνει για το σπαθόχορτο (*Hypericum perforatum*) σε ένζυμα του κυτοχρώματος P450, στην N-ακετυλοτρανσφεράση 2 (NAT2) και στην οξειδάση της ξανθίνης (XO), το χυμό γκρέιπ φρουτ στο CYP1A2 και τα σταυρανθή (*brassica cruciferae*) και σελινοειδή (*apiaceous*) λαχανικά στα ένζυμα CYP1A2, NAT2 και XO (Wenk *et al.*, 2014, Fuhr *et al.*, 1993, Lampe *et al.*, 2000).

Επίσης, σε αρουραίους έχει μελετηθεί η επιρροή του χαμομηλιού (*chamomile*), του ταραξακού (*dandelion*) και της μέντας (*peppermint*) σε ένζυμα φάσης I και II του μεταβολισμού (Maliakal and Wanwimorluk, 2001). Τέλος, έχει μελετηθεί η επίδραση της υδατικού εκχυλίσματος της υδραστίδας (*Hydrastis canadensis*), του Κάβα κάβα (*Piper methysticum*) και της σιμισιφούγκας (*Cimicifuga racemosa*) στη λειτουργία του ενζύμου CYP2D6 (Gurley *et al.*, 2008).

1.7 Καφεΐνη-μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης

Η καφεΐνη ανήκει στην κατηγορία των μεθυλοξανθινών. Αποτελεί την πιο διαδεδομένη διεγερτική ουσία στον κόσμο και βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στον καφέ και στο τσάι. Η καφεΐνη μειώνει την κόπωση και αυξάνει την πνευματική εγρήγορση. Σε μεγάλες δόσεις προκαλεί θετική ινότροπο και χρονότροπο δράση στην καρδιά, έχει μικρή διουρητική δράση και

διεγείρει την έκκριση υδροχλωρικού οξέος στο γαστρικό βλεννογόνο. Η καφεΐνη, όταν χορηγείται από το στόμα, κατανέμεται σε όλο το σώμα, διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, τον πλάκουντα και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα. Μεταβολίζεται στο ήπαρ και απεκκρίνεται στα ούρα και στο στέλε (Harvey and Champe, 2007). Η μέγιστη συγκέντρωσή της στο πλάσμα επιτυγχάνεται μια ώρα μετά τη χορήγησή της. Η απέκκρισή της από τον οργανισμό γίνεται μετά από τρεις έως έξι ώρες (Carillo and Benitez, 2000). Η ασφάλεια που παρέχει η κατανάλωσή της σε φυσιολογικές δόσεις, αλλά και το γεγονός ότι μεταβολίζεται σε μεγάλο βαθμό από το CYP1A2 καθιστούν την καφεΐνη ως το κατάλληλο φάρμακο δείκτης για την διερεύνηση της λειτουργίας του υπό μελέτη ενζύμου.

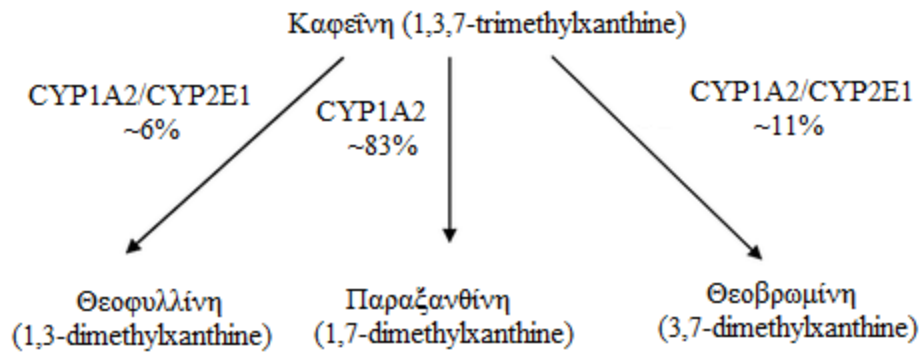
Μελέτες *in vivo* και *in vitro*, έδειξαν ότι η καφεΐνη μεταβολίζεται, κυρίως, με N-3 απομεθυλίωση, προς παραξανθίνη (1,7-dimethylxanthin, 17X), μια διαδικασία που καταλύεται σε ποσοστό 83% από το CYP1A2 (Begas *et al.*, 2015, Begas *et al.*, 2007). Επιπρόσθετα, με N-1 απομεθυλίωση, η καφεΐνη μεταβολίζεται προς θεοβρωμίνη (3,7-dimethylxanthin, 37X) και, με N-7 απομεθυλίωση, προς θεοφυλλίνη (1,3-dimethylxanthine, 13X). Το CYP1A2 ευθύνεται για το 11-12% και 4-5% των δύο προαναφερθέντων απομεθυλίωσεων, αντίστοιχα (Arnaud, 2011). Ακόμη, είναι υπεύθυνο σχεδόν για το 100% της ηπατικής 3-απομεθυλίωσης της καφεΐνης (Kot and Daniel, 2008). Επομένως, το CYP1A2 συμμετέχει στον πρωτογενή μεταβολισμό της καφεΐνης σε ποσοστό άνω του 95% (Kalow and Tang, 1993). Μικρό ποσοστό των N-1 και N-7 απομεθυλίωσεων αποδίδεται σε δράση άλλων ενζύμων, όπως το CYP2E1, CYP2C8/9 και το CYP3A4 (Gu *et al.*, 1992, Kot and Daniel, 2008).

Η 17X υδροξυλιώνεται, με την καταλυτική δράση του CYP1A2 και του CYP2A6, προς 1,7-διμεθυλουρικό οξύ (1,7-dimethyluric acid, 17U) (Arnaud, 2011). Η 17X μετατρέπεται, με N-7 απομεθυλίωση, σε ασταθές ενδιάμεσο με ανοιχτό δακτύλιο που είτε σταθεροποιείται με ακετυλίωση από την NAT2 ως 5-ακετυλαμινο-6-φορμυλαμινο-3-μεθυλουρικό οξύ (5-acetylamin-6-formylamin-3-methyluric acid, AFMU), είτε μετατρέπεται με εσωτερική αναδιάταξη σε 1-μεθυλοξανθίνη (1-methylxanthine, 1X) (Tang *et al.*, 1983, Lelo *et al.*, 1989). Τέλος, η 1X, με τη βοήθεια της XO, βιομετατρέπεται, με 8-υδροξυλίωση, προς 1-μεθυλ-ουρικό οξύ (1-methyluric acid, 1U) (Grant *et al.*, 1986) (**Εικόνες 3,4**).

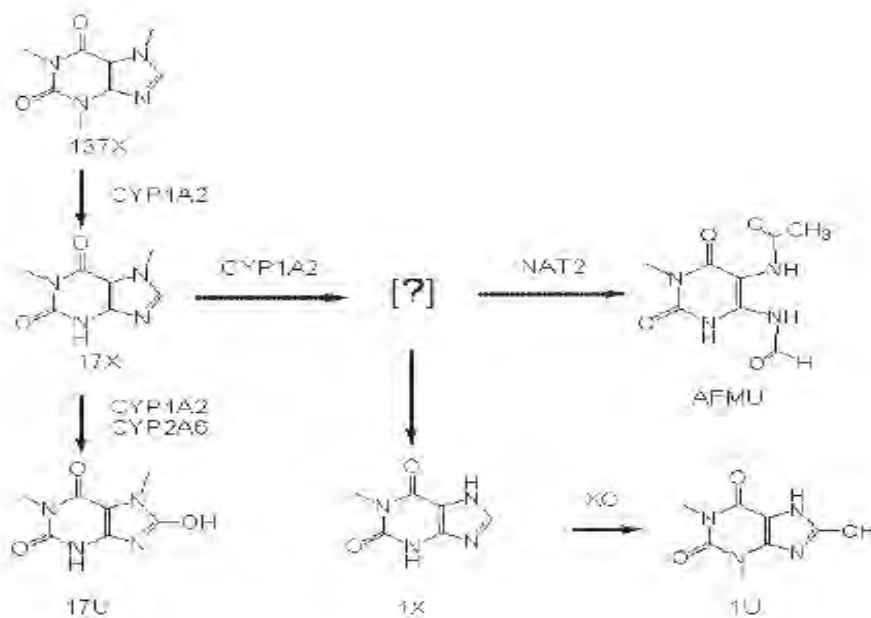
Οι μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης (1,3,7-trimethylxanthin, 137X) χρησιμοποιούνται ευρέως με σκοπό την αποσαφήνιση της ενεργότητας του CYP1A2 στο αίμα, στο πλάσμα, στον ορό του αίματος, στα ούρα και στο στέλε (Begas *et al.*, 2015).

Στο παρελθόν, έχουν προταθεί αρκετοί μεταβολικοί λόγοι που περιγράφουν την ενεργότητα του CYP1A2, τόσο στα ούρα όσο και στο στέλε, βασιζόμενοι στο μεταβολισμό της καφεΐνης. Για το στέλε, ο μεταβολικός λόγος που αντιπροσωπεύει τη δραστηριότητα του CYP1A2 είναι ο 17X/137X (Fuhr and Rost, 1994). Στην παρούσα εργασία, εξετάζεται, επίσης, ο μεταβολικός

λόγος $37X/137X$ που αφορά στην μεταβολική οδό της θεοβρωμίνης στο σίελο. Για τα ούρα, ο κατάλληλος μεταβολικός λόγος για την περιγραφή της λειτουργίας του CYP1A2 είναι ο $(AFMU+1U+1X)/17U$ (Campbell *et al.*, 1987).



Εικόνα 3: Πρωτογενής μεταβολισμός της καφεΐνης (Arnaud *et al.*, 2011).



Εικόνα 4: Η κύρια οδός μεταβολισμού της καφεΐνης: οδός 17MX (Gu *et al.*, 1992).

1.8 Σκοπός

Η εργασία που πραγματοποιήθηκε είχε ως σκοπό τη διερεύνηση της *in vivo* δραστικότητας του ενζύμου CYP1A2, μετά από κατανάλωση τσαγιού Κρόκου Κοζάνης από υγιείς εθελοντές, αφού εξ'αρχής παρατηρήθηκε έλλειψη βιβλιογραφίας και στοιχείων που να περιγράφουν την *in vivo* επίδραση του τσαγιού Κρόκου Κοζάνης στο ένζυμο χρησιμοποιώντας ως φάρμακο-δείκτη την καφεΐνη.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εθελοντές και πειραματικό πρωτόκολλο

Στην τρέχουσα έρευνα συμμετείχαν 9 υγιείς εθελοντές (8 άνδρες και 1 γυναίκα) (Πίνακας 1). Οι εθελοντές συμμετείχαν στην μελέτη μετά από γραπτή συγκατάθεσή τους. Η καλή κατάσταση της υγείας τους διαπιστώθηκε με αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη συμμετοχή των εθελοντών στην μελέτη ήταν η αποχή μίας εβδομάδας πριν, αλλά και κατά την διάρκεια του πρωτοκόλλου, από τα παρακάτω φάρμακα: παρακεταμόλη, ομεπραζόλη, φαινυνοϊνη, ριφαμπικίνη, φλουβοξαμίνη, μεξιλετίνη, βεραπαμίλη, φλουραφυλίνη, ψωραλένιο, κινολόνες, σιμετιδίνη, κετοκοναζόλη, τερβιναφίνη, μικοναζόλη, αλλοπουρινόλη και το αλκοόλ. Η μελέτη ήταν εγκεκριμένη από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (αριθμός έγκρισης 42396).

Κατά την έναρξη της μελέτης συμπληρώθηκε ερωτηματολόγιο με τα βασικά χαρακτηριστικά των εθελοντών (ηλικία, ύψος, βάρος, πιθανή φαρμακευτική θεραπεία), καθώς και του τρόπου ζωής (επάγγελμα, κατανάλωση αλκοόλ, κάπνισμα, έκθεση σε χημικές ουσίες) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά των εθελοντών.

Κωδικός	Φύλο	Ηλικία	Βάρος (kg)	Ύψος (cm)	BMI	Κάπνισμα
1	Γ	56	63	165	23,14	OXI
2	A	25	130	185	37,98	OXI
3	A	25	67	188	18,96	OXI
4	A	25	92	188	26,03	OXI
5	A	26	84	182	25,36	OXI
6	A	19	80	176	25,83	OXI
7	A	24	75	180	23,15	OXI
8	A	33	89	190	24,65	OXI
9	A	22	80	177	25,54	OXI
M.O.		28,33	84,44	181,22	25,62	
T.A.		11.02	19,51	7,85	5,13	

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε μετά την παρέλευση της πρώτης εβδομάδας, διαμορφώθηκε ως εξής:

1. Αποχή τριανταέξι ωρών από τρόφιμα και ποτά τα οποία περιείχαν μεθυλοξανθίνες πριν την λήψη της καφεΐνης. Αυτή η αποχή είναι απαραίτητη για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας καφεΐνης και τη λήψη δειγμάτων ούρων και σιέλου, και εφαρμόστηκε κάθε φορά που γινόταν δοκιμασία καφεΐνης.

2. Το πρωί της πρώτης ημέρας οι εθελοντές, μετά την έγερση, άδειασαν την κύστη τους και μαζί με ένα πρωινό γεύμα έλαβαν μια κάψουλα που περιείχε 200mg καφεΐνης. Κατόπιν, έγινε συλλογή των ούρων του πρώτου πενταώρου, από την ώρα λήψης της καφεΐνης, σε ουροσυλλέκτη. Σε ξεχωριστό ουροσυλλέκτη, οι εθελοντές συγκέντρωσαν τα ούρα του διαστήματος μεταξύ της πέμπτης και έκτης ώρας από τη λήψη της καφεΐνης. Ακόμη, στο τέλος της έκτης ώρας ελήφθη δείγμα σιέλου. Αμέσως μετά, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο χώρο του εργαστηρίου όπου έλαβε χώρα ογκομέτρηση καθώς και ρύθμιση του pH των δειγμάτων ούρων, με διάλυμα HCl 6N, σε τιμές 3-3,5 για αποφυγή διάσπασης του μεταβολίτη AFMU (Wong *et al.*, 2002). Ακολούθως, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C. Τα δείγματα αυτά αντιπροσώπευαν την περίοδο ελεύθερης διαίτας (δείγματα ελεύθερης διαίτας).

3. Ταυτόχρονα και για τις επόμενες δεκατέσσερις μέρες οι εθελοντές απέχουν από τρόφιμα και ποτά που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη δραστηριότητα του CYP1A2. Αυτά περιελάμβαναν: όλα τα φρούτα, όλα τα λαχανικά, ψητά και τηγανητά ψάρια, κόκκινα ψάρια, πατάτες τηγανητές, κριτσίνια, φρυγανιές, ρίγανη, θυμάρι, πιπέρι, δυόσμος, δεντρολίβανο, μυρωδικά, μπαχαρικά, γκρέϊπ-φρουτ, ψητά και τηγανητά κρέατα, ροφήματα από τσάι, χαμομήλι, διάφορα βότανα και κρόκο αυγού (ελεγχόμενη διαίτα, *Crocus Sativus* L., ΠΠΟ).

4. Το απόγευμα της πέμπτης ημέρας εφαρμόστηκε στους εθελοντές εκ νέου αποχή τριανταέξι ωρών από καφεϊνούχα ροφήματα και τρόφιμα, καθώς το πρωί της έβδομης μέρας πραγματοποιήθηκε δοκιμασία καφεΐνης με λήψη κάψουλας καφεΐνης και συλλογή δειγμάτων ούρων και σιέλου, κατά τον ίδιο τρόπο με την δοκιμασία καφεΐνης που έλαβε χώρα κατά την πρώτη ημέρα του πρωτοκόλλου. Τα δείγματα αυτά αντιπροσώπευαν την περίοδο ελεγχόμενης διαίτας (*Crocus Sativus* L., ΠΠΟ).

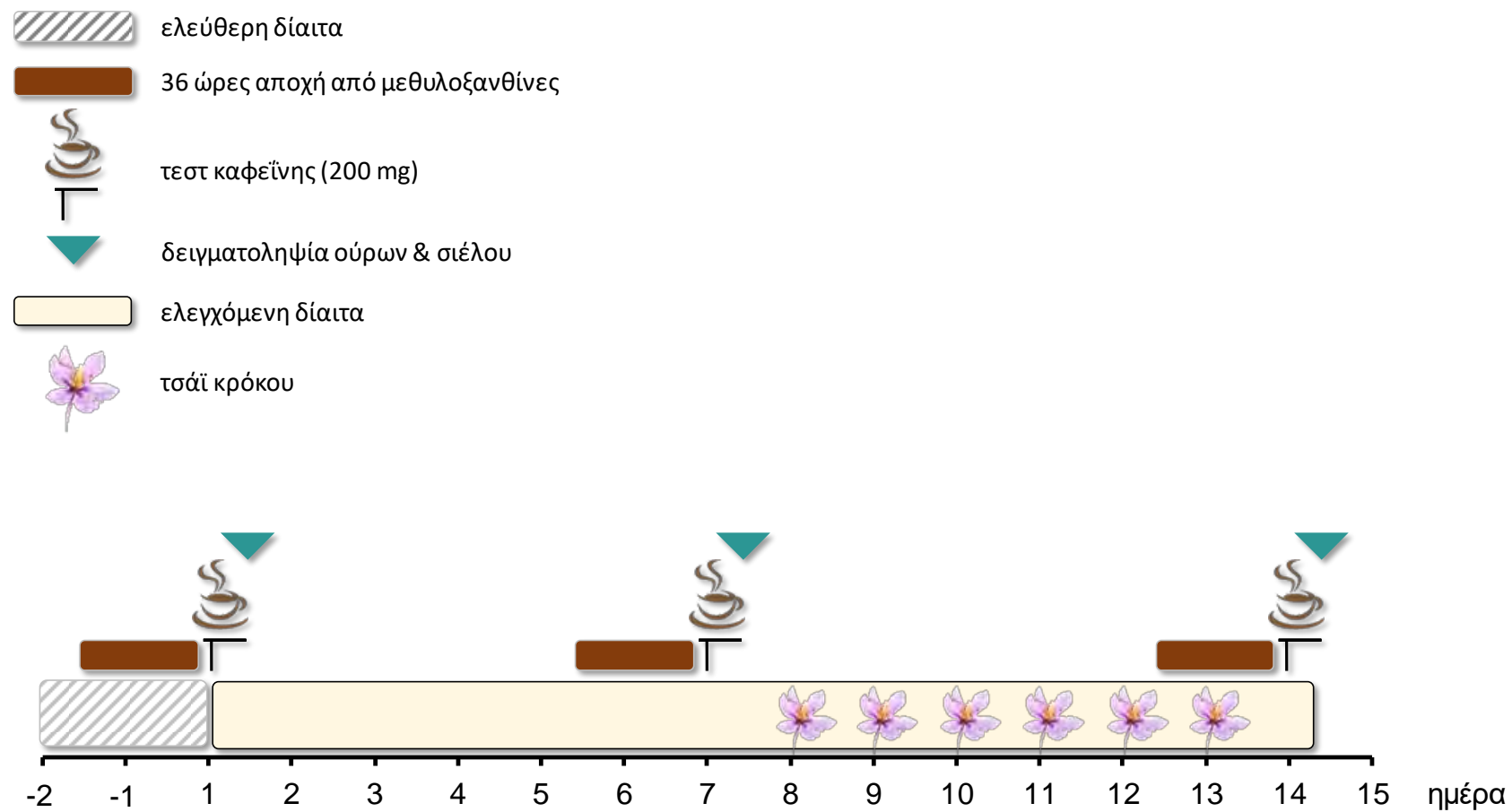
5. Τις επόμενες έξι μέρες (8^η-13^η), οι εθελοντές κατανάλωσαν καθημερινά ρόφημα Κρόκου Κοζάνης το οποίο ετοιμάζονταν από το βράδυ της ημέρας πριν την κατανάλωση αφεψήματος. Η διαδικασία ετοιμασίας του ροφήματος ήταν η εξής: 300mg αποξηραμένων στιγμάτων Κρόκου Κοζάνης υπό τη μορφή σκόνης προστέθηκαν σε 100ml νερού θερμοκρασίας

περίπου 80°C. Στη συνέχεια, το τσάι κρόκου Κοζάνης αποθηκεύτηκε σε σκοτεινό μέρος και καταναλώθηκε, μετά από δώδεκα ώρες.

6. Το απόγευμα της ημέρας λήψης του προτελευταίου ροφήματος (12^η) οι εθελοντές έκαναν αποχή από καφεϊνούχα τρόφιμα ή ροφήματα για τριανταέξι ώρες. Το βράδυ της 13^{ης} ημέρας, οι εθελοντές έλαβαν το τελευταίο τσάι Κρόκου Κοζάνης και το πρωί της 14^{ης} ημέρας, κατανάλωσαν την κάψουλα καφεΐνης. Ακολούθησε η συλλογή των δειγμάτων ούρων και σιέλου και ολοκληρώθηκε το πρωτόκολλο. Τα δείγματα αυτά αντιπροσώπευαν την περίοδο της ελεγχόμενης διαίτας με ταυτόχρονη λήψη Κρόκου Κοζάνης (*Crocus Sativus* L., META).

Συνοπτικά, μετά την ολοκλήρωση των τριών δοκιμασιών καφεΐνης, συλλέχτηκαν τρεις ομάδες δειγμάτων ούρων και σιέλου (**Εικόνα 5**):

- Δείγματα ελεύθερης διαίτας
- Δείγματα ελεγχόμενης διαίτας (*Crocus Sativus* L., ΠΠΟ)
- Δείγματα ελεγχόμενης διαίτας με ταυτόχρονη λήψη τσαγιού Κρόκου Κοζάνης (*Crocus Sativus* L., META)



Εικόνα 5: Πρωτόκολλο συλλογής δειγμάτων.

2.2 Αναλυτική μέθοδος

2.2.1 Αντιδραστήρια και χημικές ουσίες

Ο Κρόκος Κοζάνης (*Crocus Sativus* L.) που χρησιμοποιήθηκε ήταν σε μορφή σκόνης και προμηθεύθηκε από την τοπική αγορά της Λάρισας. Το προϊόν διανέμεται με την εμπορική ονομασία «Krokos Kozanis, Kozani, Greece» και παράγεται από την εταιρία «Kozani Saffron Producers Cooperative» που έχει αναπτύξει πιστοποιημένη βιολογική καλλιέργεια του Κρόκου Κοζάνης και έχει εξασφαλίσει πιστοποίηση ποιότητας ISO 9001 το 1997. Η προμήθεια της καφεΐνης (137X) έγινε από την εταιρία Fluka (Γερμανία). Οι μεταβολίτες 17X, 1U, 17U καθώς και η παρακεταμόλη προμηθεύθηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (Γερμανία). Ο μεταβολίτης 1X εξασφαλίστηκε από την εταιρία TCI (Βέλγιο), η ισοπροπανόλη από τη Fisher Scientific (M. Βρετανία), το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη από την εταιρία Chem-Lab (Βέλγιο), το οξικό οξύ (άνυδρο) από την εταιρία Merck (Γερμανία), το θειϊκό αμμώνιο και το χλωροφόρμιο από την εταιρία CARLO ERBA (Γαλλία) και το υδροχλωρικό οξύ ($\geq 37\%$) από την εταιρία Sigma-Aldrich (Γερμανία). Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκε AFMU καθαρότητας 98% το οποίο ήταν ευγενική χορηγία του κ.W.Pfleiderer (Πανεπιστήμιο Konstanz, Γερμανία). Το υδροχλωρικό οξύ, το οξικό οξύ, το χλωροφόρμιο και το θειϊκό αμμώνιο ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας ενώ το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη ήταν βαθμού καθαρότητας HPLC. Καθ'όλη τη διάρκεια της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε υπερκαθαρό ύδωρ, αγωγιμότητας 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

2.2.2 Συσκευές χρωματογραφίας

Για την ανάλυση των δειγμάτων καφεΐνης και των μεταβολιτών της, έγινε χρήση διάταξης χρωματογραφίας η οποία αποτελείται από τα εξής μέρη: αντλία υψηλής πίεσης Marathon III (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη), ανιχνευτή υπεριώδους/ορατού FASMA 500 με μεταβλητό μήκος κύματος (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη) και βαλβίδα εισαγωγής δείγματος Rheodyne 7125 (Rheodyne, ΗΠΑ) στην οποία ήταν συνδεδεμένοι βρόχοι σταθερού όγκου 20 μL και 50 μL , κατά περίπτωση. Χρησιμοποιήθηκε, ακόμη, χρωματογραφική στήλη Kromasil 100 C18, διαμέτρου σωματιδίων πλήρωσης 5 μm , μήκους 250mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6mm (Macherey-Nagel, Γερμανία). Η στήλη ήταν τοποθετημένη σε θερμοστατούμενο κλίβανο. Ο αέρας απομακρύνονταν από την κινητή φάση συνεχώς μέσω χρήσης ενός ηλεκτρικού απαερωτή (ERC, Ιαπωνία). Η πρόσληψη και η ανάλυση των αναλογικών/ψηφιακών δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Chrom & Spec (Ampersand Ltd, Ρωσία).

2.2.3 Χρωματογραφικές συνθήκες

1. Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα.

Για να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα, καθορίστηκαν συγκεκριμένες συνθήκες υπό τις οποίες έγινε εφικτή η χρωματογραφική ανάλυση. Οι συνθήκες αυτές ήταν σύμφωνες με αυτές που περιγράφονται από τον Begas *et al* (2007). Η κινητή φάση αποτελούνταν από διάλυμα οξικού οξέος 0,1%, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο σε αναλογία όγκων 92/4/5. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν 30°C. Η ροή της κινητής φάσης προσαρμόστηκε ως εξής: στα πρώτα πέντε λεπτά ρυθμίστηκε στα 0,7mL/min, ενώ στα επόμενα 20min αυξήθηκε στα 1,1mL/min. Η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε στα 280nm.

2. Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της καφεΐνης, της παραξανθίνης και της θεοβρωμίνης στο σίελο.

Η ανάλυση της 137X, της 17X και της 37X στο σίελο έγινε σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται από τον Begas *et al* (2015): η κινητή φάση αποτελούνταν από μίγμα 0,1% οξικού οξέος, μεθανόλης και ακετονιτρίλιου σε αναλογία όγκων 80/20/2, ενώ η ταχύτητα ροής ρυθμίστηκε στο 1mL/min για 20'. Η χρωματογραφική στήλη διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 30°C. Η ανίχνευση της 137X, της 17X και της 37X έγινε στα 273nm.

2.3 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες προτύπων ουσιών οι οποίες ζυγίστηκαν σε ζυγό Gibertini (Gibertini Elettronica s.r.l. – Μιλάνο, Ιταλία) ευαισθησίας 0,1mg. Αφού ζυγίσθηκαν οι επιθυμητές ποσότητες, διαλύθηκαν σε κατάλληλο διαλύτη.

2.3.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων των μεταβολιτών της 137X στα ούρα.

Κατ'αρχάς, παρασκευάσθηκαν πυκνά διαλύματα όλων των μεταβολιτών, τα οποία αποθηκεύθηκαν στους -20°C. Συγκεκριμένα, παρασκευάσθηκαν διαλύματα 1X, 1U, 17U συγκέντρωσης 5 mM με διαλύτη NaOH 5 mM και διαλύματα AFMU 5mM και 4-ακεταμιδοφαινόλης (εσωτερικού προτύπου), 10mM σε οξικό οξύ 0,1%. Τελικά, παρασκευάστηκε μίγμα των διαλυμάτων των μεταβολιτών που προαναφέρθηκαν με τελική συγκέντρωση 800 μM. Το τελικό μίγμα ήταν αυτό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων στα ούρα, αφού κάθε φορά διαλύονταν ποσότητά του σε ούρα υγιούς ατόμου που είχαν ληφθεί μετά από τετραήμερη αποχή από μεθυλοξανθίνες. Συγκεκριμένα, παρασκευάσθηκαν πέντε πρότυπα διαλύματα των μεταβολιτών σε ούρα ελεύθερα

μεθυλοξανθινών συγκέντρωσης 10, 20, 50, 100, 200 και 400μM. Τα ανωτέρω πρότυπα διαλύματα επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν με την διαδικασία που περιγράφεται στην «Επεξεργασία δειγμάτων ούρων» προς κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης.

2.3.2 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων 137X, 17X και 37X στο σίελο

Αρχικά παρασκευάστηκαν διαλύματα 137X και 17X 5mM σε υπερκαθαρό νερό, όπως και διάλυμα 37X 5mM σε NaOH 5mM. Σημειώνεται, ακόμη, ότι το διάλυμα της 4-ακεταμιδοφαινόλης (εσωτερικού προτύπου) είχε συγκέντρωση 66μM και παρασκευάστηκε με υπερκαθαρό νερό. Τα πυκνά αυτά διαλύματα αποθηκεύθηκαν στους -20°C. Για την κατασκευή των πρότυπων διαλυμάτων στο σίελο, ετοιμάστηκε μίγμα των παραπάνω διαλυμάτων σε τελική συγκέντρωση 200μM. Με διάλυση ποσότητας μίγματος σε σίελο υγιούς ατόμου, η λήψη του οποίου έγινε μετά από τετραήμερη αποχή κατανάλωσης μεθυλοξανθινών, κατασκευάζουμε πρότυπα διαλύματα των μεταβολιτών επιθυμητής συγκέντρωσης. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν 5 πρότυπα διαλύματα 137X και μεταβολιτών σε σίελο υγιούς ατόμου ελεύθερο μεθυλοξανθινών. Τα ανωτέρω πρότυπα διαλύματα επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν με την διαδικασία που περιγράφεται στην «Επεξεργασία δειγμάτων σιέλου» προς κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης.

2.4 Επεξεργασία δειγμάτων ούρων

Για την επεξεργασία των δειγμάτων ούρων, προστίθενται σε δοκιμαστικό σωλήνα 250mg (NH₄)₂SO₄, 200μL δείγματος ούρων, 200μL διαλύματος οξικού οξέος 0,1% και 20μL εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη 10mM). Το θειϊκό αμμώνιο χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών που ενδεχομένως βρίσκονται μέσα στα ούρα. Το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα ανακινείται για 10' με συσκευή vortex. Ακολούθως, εισάγονται 6 mL οργανικού διαλύτη που αποτελείται από χλωροφόρμιο/ισοπροπανόλη σε αναλογία όγκων 85/15. Κατόπιν, το μίγμα ανακινείται με vortex για 1' ούτως ώστε οι μεταβολίτες να περάσουν από την υδατική φάση των ούρων στην οργανική φάση και έπειτα κάθε δείγμα φυγοκεντρείται για 2min σε 5000rpm για τον πλήρη διαχωρισμό των δύο φάσεων. Επόμενο στάδιο στην επεξεργασία των δειγμάτων είναι η εισαγωγή του δείγματος στη διαχωριστική χοάνη, όπου απομονώνεται η οργανική φάση, ενώ η υδατική φάση απορρίπτεται. Τέλος, γίνεται εξάτμιση της οργανικής φάσης με ήπιο ρεύμα N₂ σε θερμοκρασία 45°C. Το ίζημα των μεταβολιτών επαναιωρείται σε 200μL οξικού οξέος 0,1% και 20μL από αυτά εισάγονται στη χρωματογραφική στήλη προς ανάλυση των μεταβολιτών.

2.5 Επεξεργασία δειγμάτων σιέλου

Αρχικά, τα δείγματα του σιέλου φυγοκεντρούνται για 6' σε 5000rpm. Στη συνέχεια, λαμβάνονται 200μL από τα δείγματα του σιέλου και αναμιγνύονται, σε δοκιμαστικό σωλήνα, με 250mg θειϊκού αμμωνίου προς κατακρήμνιση των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο σίελο. Κατόπιν, προστίθενται στο δοκιμαστικό σωλήνα 100μL εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη, 66μM). Το περιεχόμενο ανακινείται για 15' σε συσκευή vortex κι έπειτα γίνεται εκχύλιση με 4mL οργανικού διαλύτη που περιέχει χλωροφόρμιο/ισοπροπανόλη σε αναλογία όγκων 85/15. Τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά για 1', ενώ στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 2min σε 5000rpm για τον πλήρη διαχωρισμό της υδατικής από την οργανική φάση. Κατόπιν, χρησιμοποιείται διαχωριστική χοάνη για να απομονωθεί η οργανική φάση. Στην συνέχεια, ο οργανικός διαλύτης εξατμίζεται με ήπιο ρεύμα N₂ στους 45°C. Τέλος, γίνεται επαναδιαλυτοποίηση της καφεΐνης και των μεταβολιτών της σε 200μL οξικού οξέος 0,1%, ήπια ανάδευση και εισαγωγή 50μL εξ' αυτών στη χρωματογραφική στήλη.

2.6 Ποιοτικός έλεγχος

2.6.1 Γραμμικότητα καμπυλών βαθμονόμησης των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα.

Προκειμένου να αποδειχθεί η γραμμική σχέση μεταξύ του λόγου του ύψους της κορυφής των μεταβολιτών προς το ύψος της κορυφής του εσωτερικού προτύπου και των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών, κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης με τη βοήθεια των προτύπων διαλυμάτων και ανάλυση αυτών. Τα πρότυπα διαλύματα ήταν συγκέντρωσης 10, 20, 50, 100, 200, 400 μM, και ετοιμάστηκαν με ανάμιξη συγκεκριμένης ποσότητας διαλύματος μεταβολιτών με ούρα υγιούς ατόμου, όπως προαναφέρθηκε. Ακολούθως, επεξεργάστηκαν όπως περιγράφεται στην «Επεξεργασία δειγμάτων ούρων» και αναλύθηκαν χρωματογραφικά για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης με την μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης (**Πίνακας 2**).

2.6.2 Γραμμικότητα καμπύλης βαθμονόμησης της καφεΐνης και των μεταβολιτών της στο σίελο.

Παρομοίως με την καμπύλη βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε για τους μεταβολίτες της καφεΐνης στα ούρα, κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης για την 137X, την 17X και την 37X στο σίελο. Πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 και 30,0μM για την 137X και την 17X και 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 και 20,0 μM για την 37MX επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως περιγράφεται στην «Επεξεργασία δειγμάτων σιέλου» (**Πίνακας 2**).

Πίνακας 2: Εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης των καμπυλών βαθμονόμησης. Εξίσωση ελάχιστων τετραγώνων μορφής $y=ax+\beta$.

Μεταβολίτης καφεΐνης στα ούρα	α	β	R^2	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)
AFMU	0,0082	0,0007	0,9991	10-400
1U	0,0086	0,0144	0,9981	10-400
1X	0,0044	0,0058	0,9999	10-400
17U	0,0035	0,0073	0,9998	10-400
Μεταβολίτης καφεΐνης στο σίελο	α	β	R^2	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)
137X	0,0991	0,1384	0,9991	0,5-30
17X	0,1043	0,0064	0,9998	0,5-30
37X	0,1048	0,0077	0,9972	0,5-20

2.7 Ακρίβεια και επαναληψιμότητα

Με σκοπό τη διερεύνηση της ακρίβειας αλλά και της επαναληψιμότητας της μεθόδου, παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα ποιοτικού ελέγχου (Quality Control, QC), αναμιγνύοντας ούρα ελεύθερα από μεθυλοξανθίνες με πρότυπα διαλύματα των μεταβολιτών της 137X και του εσωτερικού προτύπου, σε υψηλές (300 μM) και χαμηλές συγκεντρώσεις (30 μM). Κάθε ημέρα, πριν την ανάλυση των δειγμάτων των εθελοντών, γινόταν ανάλυση των δύο δειγμάτων ελέγχου ποιότητας. Με αυτήν την διαδικασία, αναλύθηκαν συνολικά τέσσερα δείγματα ελέγχου ποιότητας υψηλής συγκέντρωσης και τέσσερα χαμηλής συγκέντρωσης. Χρησιμοποιώντας τις αντίστοιχες εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης, έγινε υπολογισμός των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών σε κάθε δείγμα ελέγχου ποιότητας.

Κατ'αντίστοιχο τρόπο, παρασκευάστηκαν δύο δείγματα ελέγχου ποιότητας για την 137X, την 17X και την 37X στο σίελο, συγκέντρωσης 3 μM και 30 μM για την καφεΐνη, 2 μM και 20 μM για την 17X και 1,5 μM και 15 μM για την 37X. (**Πίνακας 3**)

Πίνακας 3: Ακρίβεια και επαναληψιμότητα των μετρήσεων των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα και στο σίελο (n=4).

	Προσθεθείσα συγκέντρωση (μM)	Μέση μετρηθείσα συγκέντρωση	Σφάλμα (bias%)	Συντελεστής διακύμανσης (CV%)	Προσθεθείσα συγκέντρωση	Μετρηθείσα συγκέντρωση	Σφάλμα (bias%)	Συντελεστής διακύμανσης (CV%)
Μεταβολίτης καφεΐνης στα ούρα								
AFMU	30,00	30,88	2,94	7,62	300,00	299,87	-0,04	5,65
1MU	30,00	31,36	4,52	4,85	300,00	308,64	2,88	4,35
1MX	30,00	30,78	2,60	4,45	300,00	306,44	2,15	3,88
17MU	30,00	28,84	-3,86	5,37	300,00	300,36	0,12	7,15
Μεταβολίτης καφεΐνης στο σίελο								
17MX	2,00	1,98	-1,19	1,95	20,00	20,90	4,50	5,09
37MX	1,50	1,51	0,47	1,69	15,00	15,20	1,33	2,48
137MX	3,00	2,94	-1,89	3,95	30,00	30,49	1,63	1,52

2.8 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν με τις μέσες τιμές και τις τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στο σίελο και στα ούρα. Η γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης προσδιορίστηκε με την ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης. Για τη διερεύνηση της μηδενικής υπόθεσης, ότι δεν υπάρχει μεταβολή της δραστηριότητας του CYP1A2 των εθελοντών όταν αυτή προσδιορίστηκε στις τρεις περιόδους μελέτης, εφαρμόστηκε η δοκιμασία t-test για σχετιζόμενα δείγματα (paired samples t-test). Οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το στατιστικό λογισμικό SPSS 13.0.

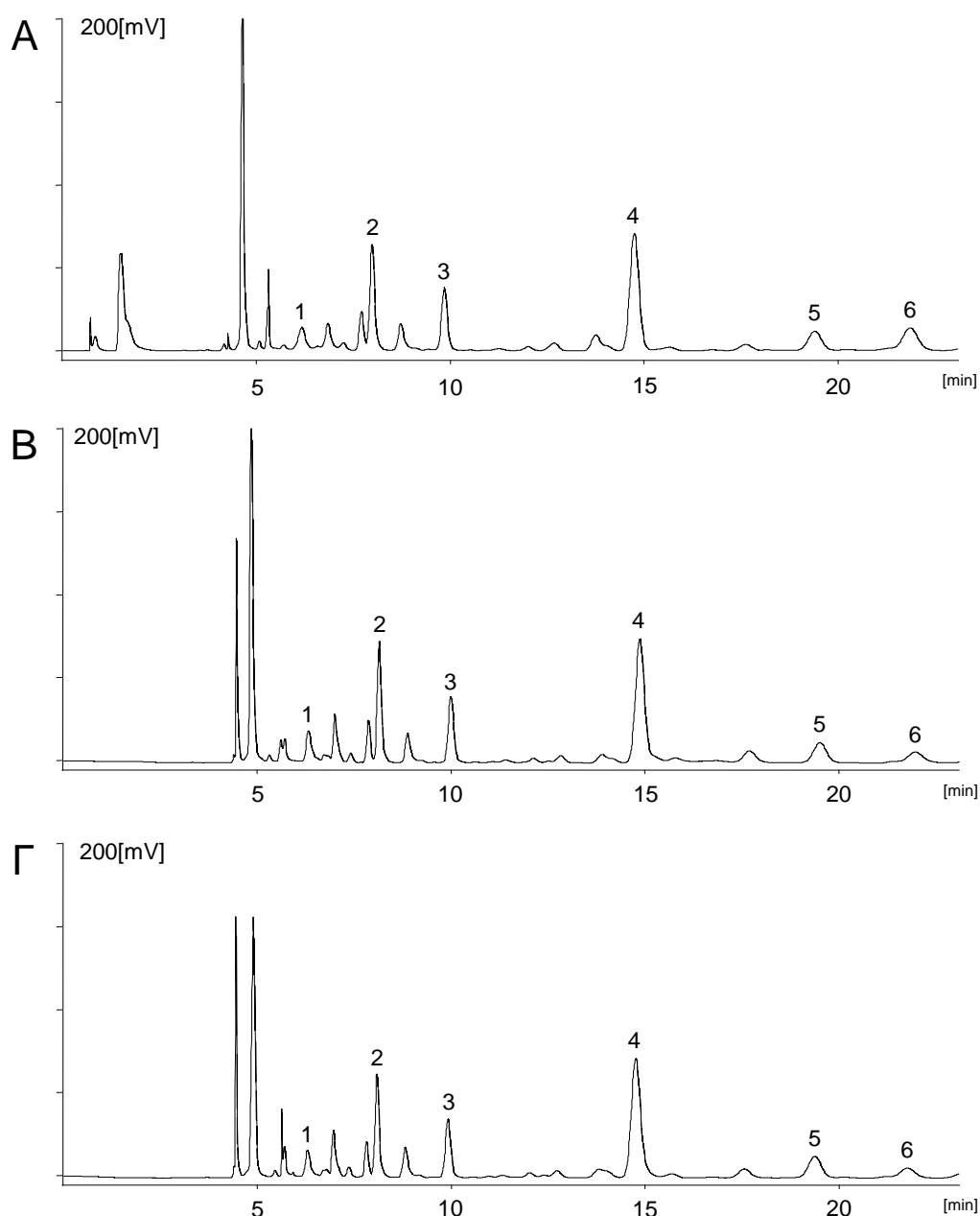
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο **Σχήμα 1**, εμφανίζονται τα χρωματογραφήματα HPLC της καφεΐνης και των μεταβολιτών της στα ούρα ενός εθελοντή για τα δείγματα του 1^{ου} πενταώρου μετά την κατανάλωση της καφεΐνης, που αφορούν την περίοδο ελεύθερης διαίτας (ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΔΙΑΙΤΑ), ελεγχόμενης διαίτας (*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ) και ελεγχόμενης διαίτας με λήψη τσαγιού Κρόκου Κοζάνης (*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ). Τα χρωματογραφήματα HPLC των μεταβολιτών της καφεΐνης στο σίελο ενός εθελοντή έξι ώρες μετά την λήψη της καφεΐνης για την περίοδο ελεύθερης διαίτας, ελεγχόμενης διαίτας (*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ) και ελεγχόμενης διαίτας με λήψη τσαγιού Κρόκου Κοζάνης (*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ), εμφανίζονται στο **Σχήμα 2**.

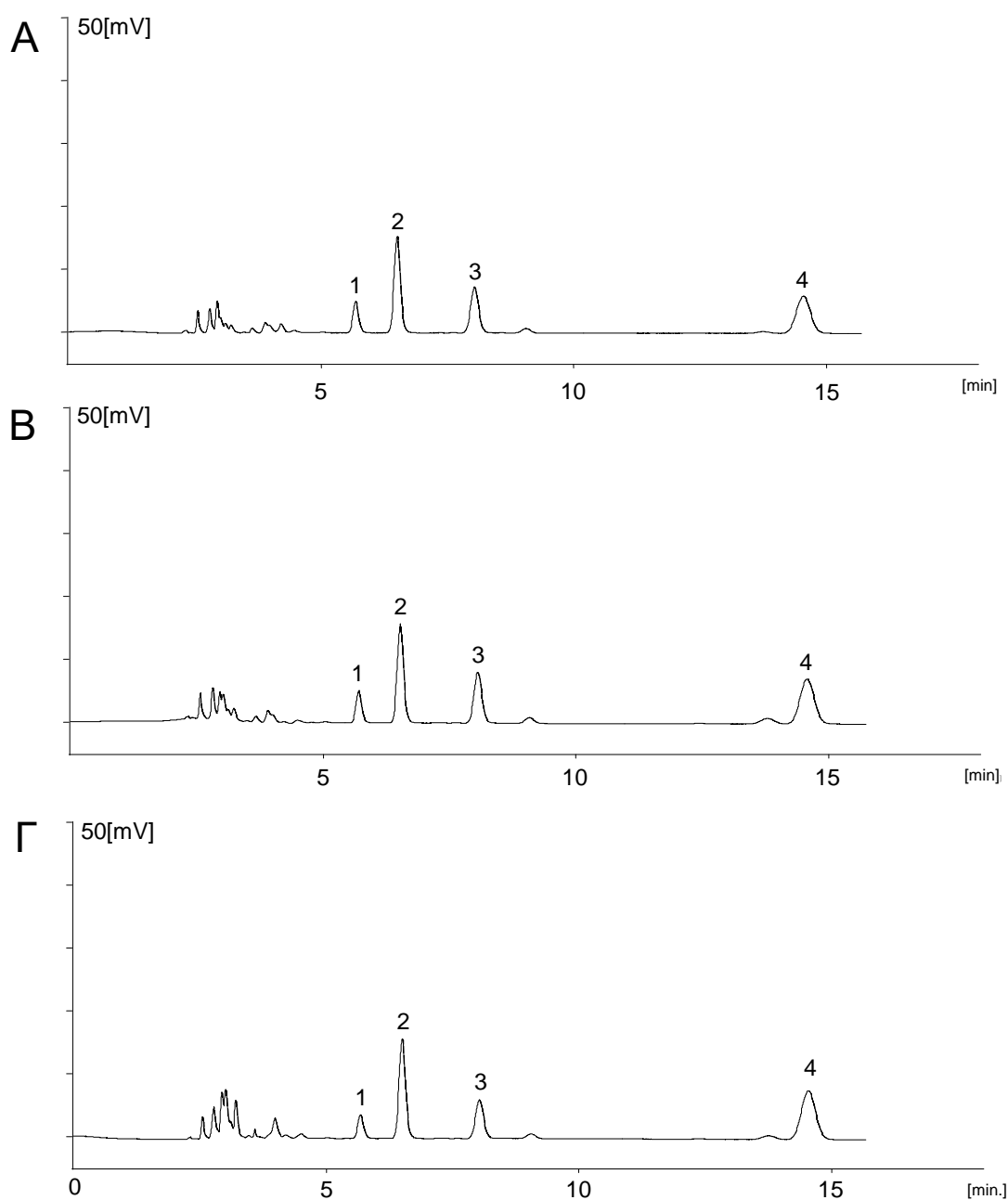
3.1 CYP1A2

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των τιμών του μεταβολικού λόγου (AFMU+1U+1X)/17U της καφεΐνης στα ούρα και του μεταβολικού λόγου 17X/137X της καφεΐνης στο σίελο οι οποίοι αντανakλούν τη δραστηριότητα του CYP1A2, εμφανίζονται στον **Πίνακα 4**.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των τιμών του μεταβολικού λόγου 37X/137X της καφεΐνης στο σίελο, ο οποίος αντανakλά τη δραστηριότητα της οδού της θεοβρωμίνης, εμφανίζονται στον **Πίνακα 4**.



Σχήμα 1: Χρωματογραφήματα HPLC μεταβολιτών καφεΐνης στα ούρα για το διάστημα 0-5h. **A:** δείγματα από την περίοδο ελεύθερης διαίτας, **B:** Δείγματα από την περίοδο ελεγχόμενης διαίτας (*Crocus Sativus* ΠΡΟ, **Γ:** Δείγματα από την περίοδο ελεγχόμενης διαίτας με ταυτόχρονη λήψη τσαγιού Κρόκου Κοζάνης (*Crocus Sativus* ΜΕΤΑ), δείκτες δραστηριότητας, 1= AFMU, 2= 1U, 3= 1X, 4= ΕΠ, 5= 17U, 6= 17X.



Σχήμα 2: Χρωματογραφήματα HPLC μεταβολιτών καφεΐνης στο σίελο. **A:** δείγματα από την περίοδο ελεύθερης διαίτας. **B:** Δείγματα από την περίοδο ελεγχόμενης διαίτας (*Crocus Sativus* ΠΡΟ), **Γ:** Δείγματα από την περίοδο ελεγχόμενης διαίτας με ταυτόχρονη λήψη τσαγιού Κρόκου Κοζάνης (*Crocus Sativus* ΜΕΤΑ). 1=37X, 2=ΕΠ, 3=17X, 4=137X.

Πίνακας 4: Τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα και στο σίελο που αντανακλούν τη δραστηριότητα του CYP1A2.

	ΟΥΡΑ†						ΣΙΕΛΟΣ††		
Κωδικός Εθελοντή	0-5 ώρες			6^η ώρα			6^η ώρα		
	Ελεύθερη δίαιτα (N=8)	<i>Crocus</i> <i>Sativus</i> L. (ΠΠΟ)	<i>Crocus</i> <i>Sativus</i> L. (ΜΕΤΑ)	Ελεύθερη δίαιτα	<i>Crocus</i> <i>Sativus</i> L. (ΠΠΟ)	<i>Crocus</i> <i>Sativus</i> L. (ΜΕΤΑ)	Ελεύθερη δίαιτα	<i>Crocus</i> <i>Sativus</i> L. (ΠΠΟ)	<i>Crocus</i> <i>Sativus</i> L. (ΜΕΤΑ)
1	3,77	3,44	2,91	3,38	3,04	2,85	0,41	0,50	0,32
2	4,80	5,40	3,41	5,56	4,87	3,50	1,49	0,94	0,66
3	5,62	5,26	4,15	6,08	4,99	3,84	0,69	0,63	0,43
4	4,92	5,44	5,64	5,54	5,37	5,42	0,80	0,64	0,46
5	3,83	3,79	4,28	3,92	4,97	4,42	0,46	0,65	0,78
6	6,04	5,16	4,96	7,25	5,72	5,56	1,26	0,99	0,78
7		4,90	3,70	4,37	4,08	4,02	0,71	0,57	0,59
8	5,19	4,23	3,51	4,11	3,91	3,27	0,62	0,72	0,53
9	5,56	4,14	3,92	4,87	3,70	3,87	0,48	0,48	0,33
M.O.	4,97	4,64	4,05	5,01	4,65	4,08*	0,77	0,68	0,52**
±T.A.	0,82	0,75	0,83	1,22	0,86	0,92	0,37	0,18	0,15

†Δείκτης CYP1A2 στα ούρα: (AFMU+1U+1X)/17U

††Δείκτης CYP1A2 στο σίελο: 17X/137X

* p=0,008, ** p<0,001, σε σχέση με *Crocus Sativus* L. (ΠΠΟ).

Πίνακας 5: Τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στο σίελο από τη μεταβολική οδό 37X/137X.

Κωδικός Εθελοντή	Σίελος†		
	Ελεύθερη διαίτα	Crocus Sativus L. (ΠΡΟ)	Crocus Sativus L. (ΜΕΤΑ)
1	0,22	0,35	0,45
2	2,27	0,28	0,90
3	0,27	0,23	0,13
4	0,76	0,12	0,18
5	1,20	0,28	0,59
6	0,69	1,59	0,72
7	0,80	0,34	0,62
8	0,92	1,02	0,62
9	0,42	0,48	0,72
M.O.	0,84	0,52	0,55
±T.A.	0,62	0,48	0,25

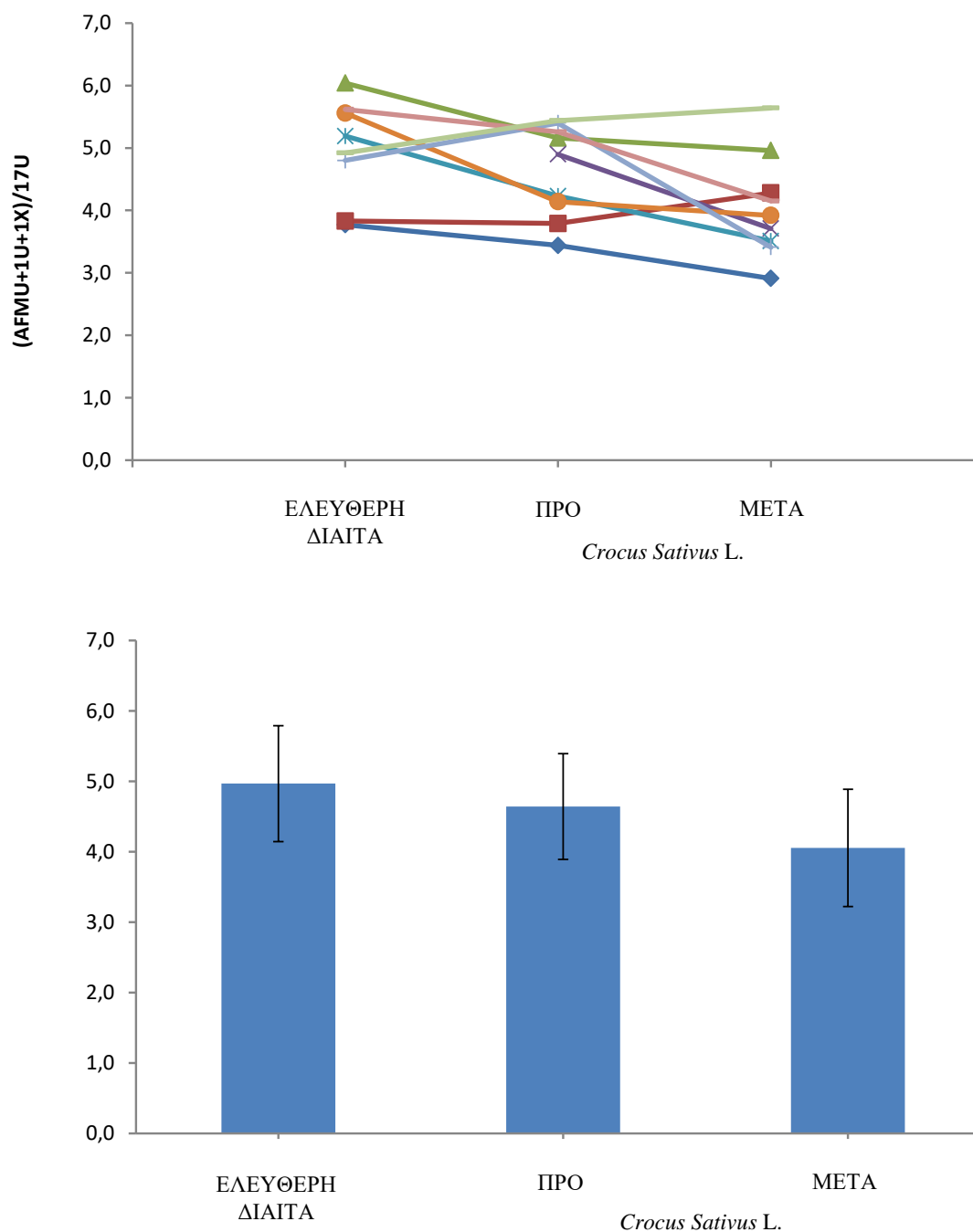
† Δείκτης CYP1A2 στο σίελο: 37X/137X.

3.1.1 Δείγματα ούρων 0-5h

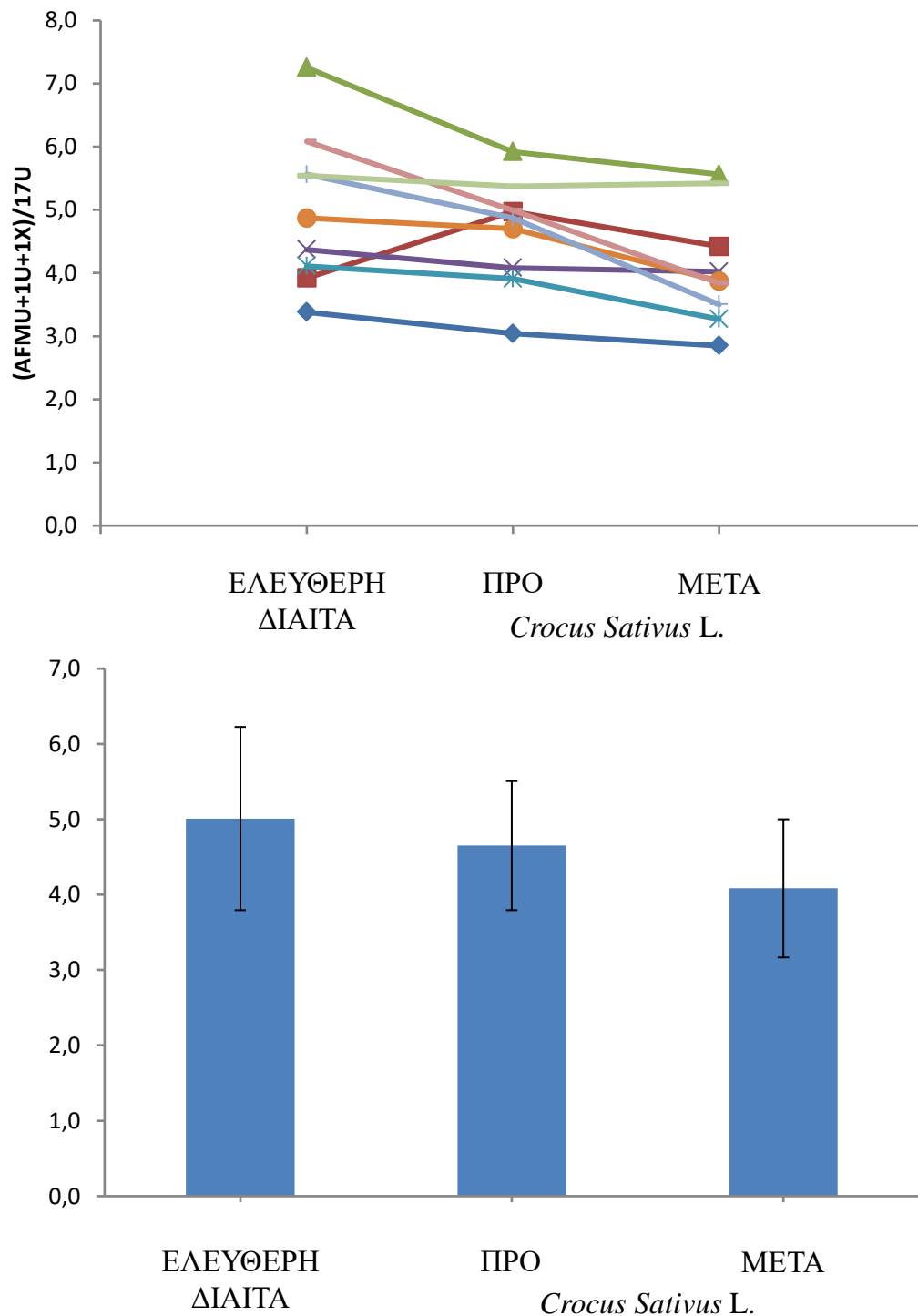
Οι μέσες τιμές του μεταβολικού δείκτη της δραστηριότητας του CYP1A2 στα δείγματα ούρων 0-5h για τις περιόδους «ελεύθερη διαίτα», «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ», «*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ» ήταν $4,97 \pm 0,82$, $4,64 \pm 0,75$, $4,05 \pm 0,83$ αντίστοιχα. Η επί τοις εκατό πτώση της μέσης τιμής του μεταβολικού λόγου από την περίοδο «ελεύθερη διαίτα» στην περίοδο «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ» και από την περίοδο «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ» στην περίοδο «*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ» ήταν 6,57% και 12,62% αντίστοιχα. Δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στις μέσες τιμές του μεταβολικού δείκτη του CYP1A2 μεταξύ των περιόδων «ελεύθερη διαίτα»-«*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ» και «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ»-«*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ» ($p=0,197$ και $p=0,051$ αντίστοιχα) (Σχήμα 3).

3.1.2 Δείγματα ούρων 6h

Οι μέσες τιμές του μεταβολικού δείκτη της δραστηριότητας του CYP1A2 στα δείγματα ούρων για τις περιόδους «ελεύθερη διαίτα», «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ», «*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ» ήταν $5,01 \pm 1,22$, $4,65 \pm 0,86$, $4,08 \pm 0,92$ αντίστοιχα. Η επί τοις εκατό πτώση της μέσης τιμής του μεταβολικού λόγου από την περίοδο «ελεύθερη διαίτα» στην περίοδο «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ» και από την περίοδο «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ» στην περίοδο «*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ» ήταν 10,06% και 12,19% αντίστοιχα. . Δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στις μέσες τιμές του μεταβολικού δείκτη του CYP1A2 μεταξύ των περιόδων «ελεύθερη διαίτα», «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ», ($p=0,151$), ενώ υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των περιόδων «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ» και «*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ», ($p=0,008$) (Σχήμα 4).



Σχήμα 3: Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης για το CYP1A2 στα δείγματα ούρων 1^{ου} πενταώρου κατά τις περιόδους «ελεύθερη διαίτα», «*Crocus Sativus L.*, ΠΡΟ» και «*Crocus Sativus L.*, META». Οι στήλες μαζί με τις οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα. $p=0,197$ και $p=0,051$.



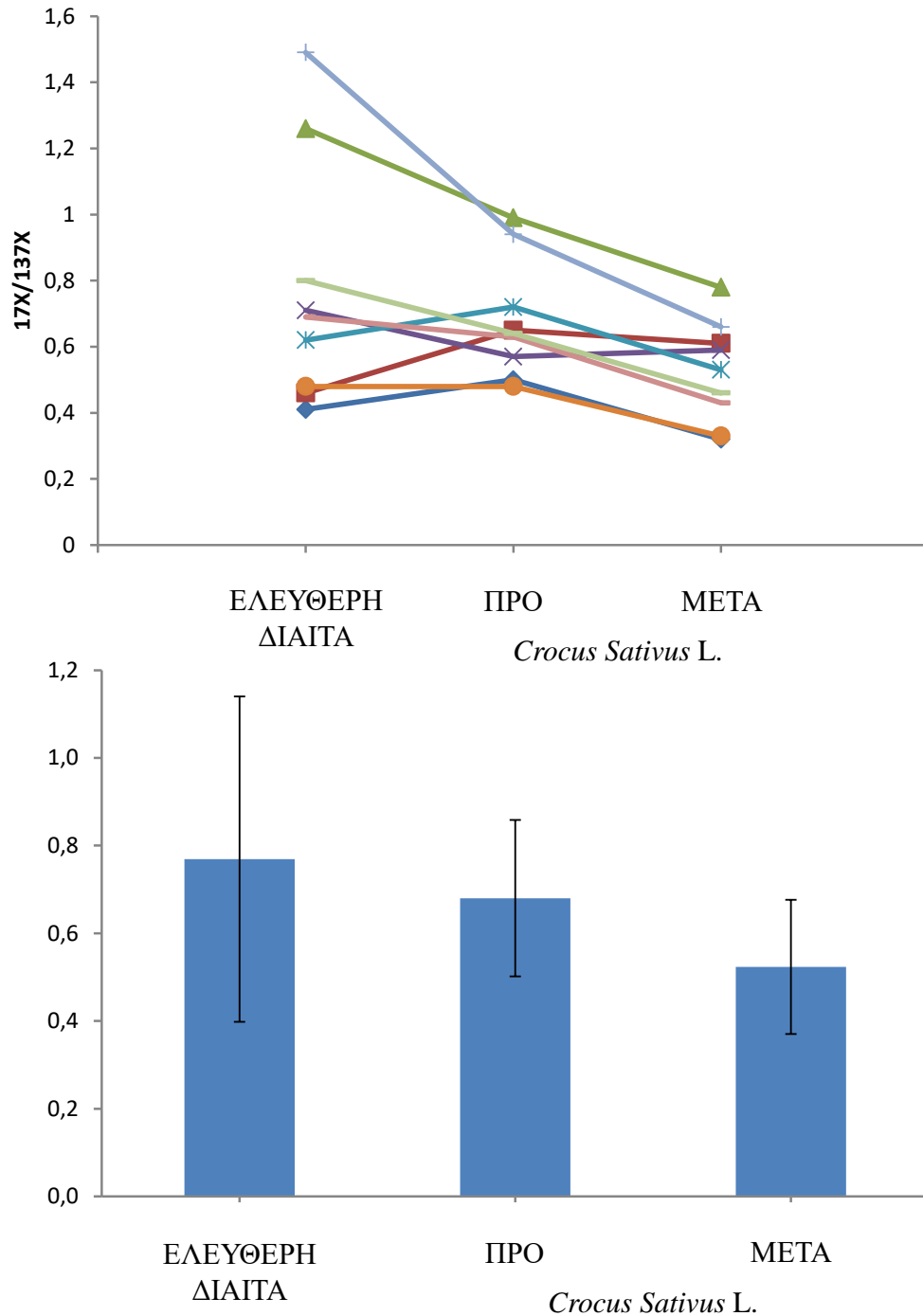
Σχήμα 4: Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης για το CYP1A2 στα δείγματα ούρων της 6^{ης} ώρας, κατά τις περιόδους «Ελεύθερη διαίτα», «*Crocus Sativus L.*, ΠΡΟ» και «*Crocus Sativus L.*, META». Οι στήλες μαζί με τις οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα. $p=0,151$ και $p=0,008$.

3.1.3 Δείγματα σιέλου (17X/137X)

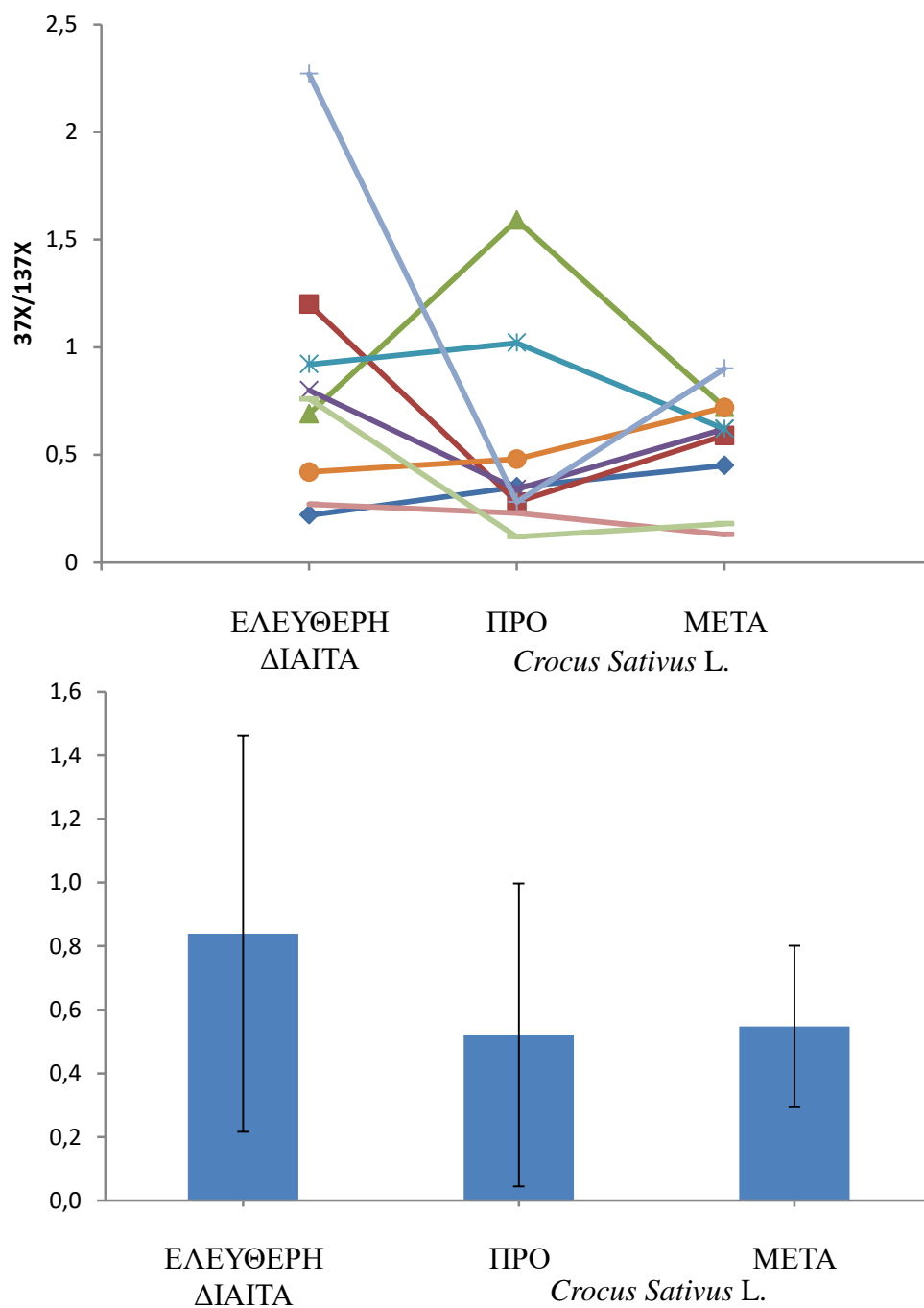
Οι μέσες τιμές του μεταβολικού δείκτη της δραστηριότητας του CYP1A2 στα δείγματα σιέλου της μεταβολικής οδού 17X/137X για τις περιόδους «ελεύθερη διαίτα», «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ», «*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ» ήταν $0,77 \pm 0,37$, $0,68 \pm 0,18$, $0,52 \pm 0,15$ αντίστοιχα. Η επί τοις εκατό πτώση της μέσης τιμής του μεταβολικού λόγου από την περίοδο «ελεύθερη διαίτα» στην περίοδο «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ» και από την περίοδο «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ» στην περίοδο «*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ» ήταν 11,56% και 23,04% αντίστοιχα. Δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στις μέσες τιμές του μεταβολικού δείκτη του CYP1A2 μεταξύ των περιόδων «ελεύθερη διαίτα»-«*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ», ($p=0,271$), ενώ υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των περιόδων «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ»-«*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ», ($p<0,001$) (Σχήμα 5).

3.1.4 Δείγματα σιέλου (37X/137X)

Οι μέσες τιμές του μεταβολικού δείκτη της δραστηριότητας του CYP1A2 στα δείγματα ούρων για τις περιόδους «ελεύθερη διαίτα», «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ», «*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ») ήταν $0,84 \pm 0,62$, $0,52 \pm 0,48$, $0,55 \pm 0,25$ αντίστοιχα. Η επί τοις εκατό μεταβολή της μέσης τιμής του μεταβολικού λόγου από την περίοδο «ελεύθερη διαίτα» στην περίοδο «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ» και από την περίοδο «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ» στην περίοδο «*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ» ήταν 37,88% πτώση και 5,12% αύξηση αντίστοιχα. Δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στις μέσες τιμές του μεταβολικού δείκτη του CYP1A2 μεταξύ των περιόδων «ελεύθερη διαίτα», «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ» και «*Crocus Sativus* L., ΠΡΟ» και «*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ» ($p=0,278$ και $p=0,860$ αντίστοιχα) (Σχήμα 6).



Σχήμα 5: Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης για το CYP1A2 στα δείγματα σιέλου, για την μεταβολική οδό της 17X, κατά τις περιόδους «Ελεύθερη διαίτα», «Crocus Sativus L., ΠΡΟ» και «Crocus Sativus L., META». Οι στήλες μαζί με τις οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα. $p=0,271$ και $p<0,001$.



Σχήμα 6: Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης για το CYP1A2 στα δείγματα σιέλου, για την μεταβολική οδό της 37X, κατά τις περιόδους «Ελεύθερη διαίτα», «*Crocus Sativus L.*, ΠΡΟ» και «*Crocus Sativus L.*, META». Οι στήλες μαζί με τις οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα. $p=0,278$ και $p=0,860$.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ανατρέχοντας σε παλαιότερες μελέτες, γίνεται αντιληπτό ότι η παρούσα έρευνα είναι η πρώτη που διερευνά την επίδραση του τσαγιού Κρόκου Κοζάνης στην *in vivo* λειτουργία του ενζύμου CYP1A2 σε ανθρώπους, χρησιμοποιώντας την καφεΐνη ως φάρμακο δείκτη. Σημειώνεται σε αυτό το σημείο ότι δόθηκε ιδιαίτερη σημασία στην αυστηρή τήρηση του πρωτοκόλλου από τους εθελοντές, ούτως ώστε να αποφευχθεί η κατανάλωση τροφίμων, ποτών ή φαρμάκων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα του CYP1A2 και να φανεί, έτσι, η πραγματική επίδραση των συστατικών του Κρόκου Κοζάνης στο προαναφερθέν ένζυμο.

Το τσάι του Κρόκου Κοζάνης καταναλώθηκε αφού προηγήθηκε κατάλληλη μέθοδος παρασκευής του. Αφού πρώτα ζυγίστηκαν 300mg αποξηραμένων κόκκινων στιγμάτων του Κρόκου Κοζάνης, προστέθηκαν σε 100ml νερού θερμοκρασίας 80°C. Μετά από σύντομη ανακίνηση, το τσάι διατηρήθηκε σε σκοτεινό μέρος και δώδεκα ώρες μετά, καταναλώθηκε. Η μέθοδος παρασκευής τσαγιού που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη έχει εφαρμοσθεί στο παρελθόν από την Chryssanthi *et al.* (2011), και αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως infusion (έγχυση). Σύμφωνα με τη αυτήν την έρευνα, κατά την οποία τα στίγματα Κρόκου Κοζάνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κοινής προέλευσης με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, το έγχυμα του Κρόκου Κοζάνης περιέχει πικροκροκίνη και κροκίνες, κυρίως την α-κροκίνη. Οι κροκίνες, τελικά, βιομετατρέπονται προς κροκετίνη η οποία τελικά εντοπίζεται στο πλάσμα. Η πικροκροκίνη έχει πολύ μικρή βιοδιαθεσιμότητα αλλά στο γαστρεντερικό σωλήνα μετατρέπεται σε σαφρανάλη, η οποία τελικά απορροφάται στο πλάσμα.

Η δοσολογία του Κρόκου Κοζάνης διαμορφώθηκε στα 300mg ξηρών κόκκινων στιγμάτων υπό μορφή σκόνης ημερησίως και λαμβάνονταν το πρωί, ως τσάι των 100ml. Η δοσολογία αυτή ήταν καλώς ανεκτή από τους εθελοντές.

4.1 CYP1A2

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 στα δείγματα ούρων του πρώτου πενταώρου, της έκτης ώρας αλλά και στα δείγματα σιέλου, μετά την περίοδο κατανάλωσης του τσαγιού Κρόκου Κοζάνης. Η λειτουργία του ενζύμου προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του μεταβολικού λόγου του στα ούρα (AFMU+1U+1X)/17U και στο σίελο 17X/137X. Η επί τοις εκατό μέση μείωση του μεταβολικού λόγου στα δείγματα ούρων του πρώτου πενταώρου ήταν 6,57% από την περίοδο ελεύθερης διαίτας στην περίοδο ελεγχόμενης διαίτας (*Crocus Sativus* L., ΠΠΟ) και 12,62% από την περίοδο ελεγχόμενης διαίτας (*Crocus Sativus* L. ΠΠΟ) στην περίοδο ελεγχόμενης διαίτας με ταυτόχρονη λήψη τσαγιού Κρόκου Κοζάνης (*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ). Η μέση μείωση του μεταβολικού λόγου ήταν

στατιστικά μη σημαντική ($p > 0,05$). Αντίστοιχα, στα δείγματα ούρων έκτης ώρας οι επί τοις εκατό μειώσεις ήταν 10,06% και 12,19% ($p = 0,008$, στατιστικά σημαντική), και στα δείγματα σιέλου ήταν 11,56% και 23,04% ($p < 0,001$, στατιστικά σημαντική). Αποδεικνύεται, έτσι, και σε αυτήν την μελέτη ότι ο μεταβολικός λόγος 17X/137X στο σίελο μας δίνει τη δυνατότητα καλύτερης απεικόνισης της δραστηριότητας του CYP1A2, καθώς, όπως υποστηρίζεται σε προηγούμενη έρευνα, η μετατροπή της 17X σε 137X γίνεται, αποκλειστικά, από το προαναφερθέν ένζυμο (Arnaud, 2011). Αντίθετα, οι μεταβολίτες του μεταβολικού λόγου που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της λειτουργίας του ενζύμου για τα δείγματα ούρων, προκύπτουν από την ταυτόχρονη δράση πολλών ενζύμων, όπως η XO και η NAT2, και έτσι προτιμάται ο μεταβολικός λόγος 17X/137X (Gu *et al.*, 1992).

Αναφορικά με τη δειγματοληψία της τρέχουσας έρευνας, λήφθηκε υπ' όψιν πως αρκετοί μεταβολίτες της καφεΐνης, όπως η 17X, αποτελούν προϊόντα και ταυτόχρονα υποστρώματα του μεταβολισμού της. Κρίθηκε, λοιπόν, σκόπιμη η συλλογή δειγμάτων ούρων έως και έξι ώρες μετά τη λήψη της κάψουλας καφεΐνης, ούτως ώστε όλες οι αντιδράσεις του μεταβολισμού της να ολοκληρωθούν πριν την συλλογή δείγματος. Στην τρέχουσα μελέτη συλλέγονται ούρα του πρώτου πενταώρου από την λήψη της κάψουλας καφεΐνης και, ως ξεχωριστό δείγμα, τα ούρα της έκτης ώρας (spot sample). Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτη, οι σχετικές αναλογίες των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα δε διέφεραν μεταξύ ολονύκτιας συλλογής, συλλογής δειγμάτων οχτώ ωρών και στιγμιαίου δείγματος (spot sample) (Notarianni *et al.*, 1995). Το συγκεκριμένο εύρημα επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα μελέτη, καθώς οι μέσες τιμές του δείκτη της δραστηριότητας του CYP1A2, τόσο για συλλογή ούρων πρώτου πενταώρου όσο και κατά την μεμονωμένη συλλογή ούρων της 6^{ης} ώρας, ήταν παρόμοιες, (Πίνακας 4), και παρουσίασαν μείωση της αυτής τάξης μεγέθους μετά την κατανάλωση του τσαγιού Κρόκου Κοζάνης (12,62% έναντι 12,19%). Ταυτόχρονα, παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη μείωση του μεταβολικού δείκτη του CYP1A2 μετά από την κατανάλωση του τσαγιού Κρόκου Κοζάνης για τα δείγματα της 6^{ης} ώρας, ενώ η αντίστοιχη διαφορά για τα δείγματα 0-5 ωρών προσέγγισε, μόνον, τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας ($p = 0,051$). Αυτό, πιθανότατα οφείλεται στη μικρότερη διαφορά μεταξύ των τυπικών αποκλίσεων που παρουσιάστηκε στα δείγματα της 6^{ης} ώρας τα οποία, εκ του γεγονότος αυτού, να έχουν μεγαλύτερη αξιοπιστία από τα δείγματα της συλλογών ούρων στην ανίχνευση διαφορών της δραστηριότητας του CYP1A2.

Όσον αφορά τα καροτενοειδή, έχουν διεξαχθεί έρευνες που μελετούν την επίδρασή τους σε ένζυμο του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών. Έχει βρεθεί ότι το λυκοπένιο, που έχει παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά με την κροκετίνη, αναστέλλει τη λειτουργία των ενζύμων CYP1A1 και

CYP1B1 σε κύτταρα MCF-7 και του ενζύμου CYP2E1 σε αρουραίους (Wang and Leung *et al.*, 2010, Louisa *et al.*, 2009, Hassan *et al.*, 2015). Ακόμη, σύμφωνα με ευρήματα άλλης έρευνας, το λυκοπένιο εμποδίζει τη μεταλλαξιγένεση των ετεροκυκλικών αμινών PhIP, οι οποίες ενεργοποιούνται από τη δράση του CYP1A2. Εξάγεται, έτσι, το συμπέρασμα ότι το λυκοπένιο έχει ανασταλτική δράση έναντι του προαναφερθέντος ενζύμου (Weisburher *et al.*, 1998). Αντιθέτως, σε έρευνα που διεξήχθη *in vivo* σε ποντικούς, δεν παρατηρήθηκε κάποια από τις δράσεις του λυκοπένιου στα ένζυμα CYP2A1, CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, όπως πρότειναν οι *in vitro* μελέτες (Jewell and O'Brien, 1998). Έτσι, ενώ οι *in vitro* μελέτες έδιναν ενδείξεις αναστολής του CYP1A2 από το λυκοπένιο και το δομικά ανάλογο του κροκίνη, κάτι τέτοιο δεν αποδεικνύεται στην *in vivo* μελέτη. Επιπλέον, επισημαίνεται ότι τα καροτενοειδή μπιξίνη, κανθαξανθίνη και ασταξανθίνη επάγουν τη λειτουργία ενζύμων του κυτοχρώματος στο ήπαρ, στους πνεύμονες, στους νεφρούς και στο έντερο ποντικών των οποίων η διατροφή περιείχε συμπληρώματα καροτενοειδών (Jewell and O'Brien, 1998). Όσον αφορά την κροκίνη και την σαφρανάλη, σύμφωνα με έρευνα σε αρουραίους που κατανάλωναν δόσεις των δύο αυτών συστατικών ημερησίως, αναφέρεται ότι η κροκίνη μειώνει τη μεταβολική ενεργότητα των ενζύμων CYP3A, CYP2C11, CYP2B και CYP2A ενώ η σαφρανάλη επάγει τη μεταβολική λειτουργία των ενζύμων CYP2C11, CYP3A και CYP2B (Dovrtělová *et al.*, 2015). Δείχθηκε ακόμη ότι οι α- και β-ιονόνες, ενώσεις με σημαντική δομική ομοιότητα με τη σαφρανάλη, επάγουν τη δράση του CYP1A2 και του CYP2B σε αρουραίους (Jeong *et al.*, 2002). Αν και από τις έρευνες σε αρουραίους δε μπορεί να εξαχθεί ασφαλές αποτέλεσμα για τους ανθρώπους, με βάση τα παραπάνω είναι πιθανό η σαφρανάλη να ασκεί επαγωγική δράση στο ανθρώπινο CYP1A2 *in vivo*. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι η καμφερόλη, η οποία υφίσταται στα κόκκινα στίγματα του Κρόκου Κοζάνης, ενδέχεται να αναστέλλει τη δράση του CYP1A2 *in vitro* (Tarantilis *et al.*, 1995, Shimada *et al.*, 2010). Σε επιπλέον μελέτη για την κουερσετίνη, που με την καμφερόλη ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονολών και μοιάζουν δομικά, παρατηρήθηκε ότι αναστέλλει σε μεγάλο βαθμό τον μεταβολισμό της καφεΐνης από το CYP1A2 (Xiao *et al.*, 2014). Μπορούμε, έτσι, να υποθέσουμε ότι και η καμφερόλη, λόγω δομικής ομοιότητας, μπορεί να αναστείλει τη λειτουργία του υπό μελέτη ενζύμου. Η συγκέντρωση, όμως, της καμφερόλης στο πλάσμα είναι πολύ χαμηλή, εξ'ατίας εκτενούς μεταβολισμού της. Γι'αυτό το λόγο είναι πολύ δύσκολο να επιτευχθούν οι απαραίτητες συγκεντρώσεις της στο πλάσμα για την εκδήλωση της δράσης της (Zabela *et al.*, 2016). Περαιτέρω έρευνες για την επίδραση των ενεργών συστατικών του κρόκου στα ένζυμα μεταβολισμού των ξενοβιοτικών δεν έχουν διεξαχθεί.

Η δεύτερη κυριότερη οδός πρωτογενούς μεταβολισμού της καφεΐνης είναι η οδός της θεοβρωμίνης, η οποία και εξετάζεται στα δείγματα σιέλου. Η λειτουργία αυτής της οδού

εκφράστηκε με το μεταβολικό λόγο 37X/137X. Παρουσιάστηκε πτώση της μέσης τιμής του μεταβολικού λόγου του ενζύμου 37,88% από την περίοδο ελεύθερης διαίτας στην περίοδο ελεγχόμενης διαίτας (*Crocus Sativus* L., ΠΠΟ) και αύξηση 5,12% από την περίοδο ελεγχόμενης διαίτας (*Crocus Sativus* L., ΠΠΟ) στην περίοδο ελεγχόμενης διαίτας με ταυτόχρονη λήψη τσαγιού Κρόκου Κοζάνης (*Crocus Sativus* L., ΜΕΤΑ). Η μεταβολή του μεταβολικού λόγου ήταν στατιστικά μη σημαντική ($p > 0,05$). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι στην παραγωγή της θεοβρωμίνης από την καφεΐνη συμμετέχουν κι άλλα ένζυμα πλην του CYP1A2, εφόσον αν συμμετείχε μόνο το CYP1A2 θα παρατηρούνταν στατιστικά σημαντική πτώση της μέσης τιμής του αντίστοιχου μεταβολικού λόγου μετά την κατανάλωση τσαγιού Κρόκου Κοζάνης, όπως και στην περίπτωση της 17X της οποίας η παραγωγή καταλύεται αποκλειστικά από το CYP1A2. Πράγματι, σε πρώιμη *in vitro* μελέτη, με τη χρήση ανασυνδυασμένου DNA, διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή της θεοβρωμίνης από την καφεΐνη καταλύεται από το CYP1A2 και το CYP2E1, με σχετική αναλογία 11/14 (Gu *et al.*, 1992). Αντίθετα, σε άλλη *in vitro* μελέτη βρέθηκε ότι για τη μετατροπή της καφεΐνης σε θεοβρωμίνη ευθύνεται αποκλειστικά το CYP1A2 (Kot and Daniel 2008). Σε μελέτες για το CYP2E1, έχει βρεθεί ότι το β-καροτένιο, ένωση με αρκετές δομικές ομοιότητες με την κροκετίνη, αυξάνει τη δράση του ενζύμου σε αρουραίους, ενώ παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην επίδραση του all-trans ρετινοϊκού οξέος, δομικού αναλόγου της σαφρανάλης, στο ίδιο ένζυμο (Paolini *et al.*, 2001, Adedoyin *et al.*, 1998). Από τα ανωτέρω, είναι πιθανόν ότι το τσάι του Κρόκου Κοζάνης να αυξάνει τη δράση του CYP2E1, ένζυμο το οποίο συμμετέχει στην μεταβολική οδό της θεοβρωμίνης, δίνοντας έτσι μια πιθανή εξήγηση στην στατιστικά μη σημαντική μεταβολή της μέσης τιμής του μεταβολικού λόγου 37X/137X μετά την κατανάλωση του τσαγιού Κρόκου Κοζάνης.

Όπως σημειώθηκε ανωτέρω, η τρέχουσα μελέτη είναι η πρώτη που εξετάζει τον τρόπο με τον οποίο το τσάι του Κρόκου Κοζάνης επηρεάζει τη δραστηριότητα του ενζύμου CYP1A2 σε υγιείς εθελοντές. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όσον αφορά τη μερική αναστολή της δράσης του ενζύμου, θα πρέπει να επιβεβαιωθούν κι από επιπλέον μελέτες με τη συμμετοχή περισσότερων εθελοντών. Ακόμη, θα ήταν χρήσιμη η διεξαγωγή ερευνών που θα αποσαφηνίζουν ποια ακριβώς συστατικά συνεισφέρουν ώστε το τσάι του Κρόκου Κοζάνης να αναστέλλει τη λειτουργία του CYP1A2, καθώς η ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία κρίνεται ελλιπής. Από τα υπάρχοντα στοιχεία, πιστεύεται ότι η πιθανή συνεργική ή προσθετική δράση της καμφορόλης και της κροκετίνης, σε αντίθεση με την πιθανή επαγωγική δράση της σαφρανάλης, περιορίζει τη δράση του CYP1A2. Πρέπει να επισημανθεί το γεγονός ότι ακόμη και μικρές ποσότητες ενώσεων μπορούν να ασκήσουν σημαντικές δράσεις στον οργανισμό, όταν

δρουν συνεργικά η προσθετικά, ενώ όταν χορηγούνται χωριστά, δεν παρατηρείται φαρμακολογική δράση (McLean and Driver, 1997, di Gresso *et al.*, 2015).

Η μερική αναστολή της δράσης του CYP1A2 ενδέχεται να επηρεάζει τη δραστηριότητα και την απέκκριση από τον οργανισμό ενός φαρμάκου που μεταβολίζεται από το συγκεκριμένο ένζυμο, καθώς επιβραδύνοντας το μεταβολισμό του, επεκτείνεται ο χρόνος δράσης του στον οργανισμό με απρόβλεπτες συνέπειες. Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι το CYP1A2 μετατρέπει προκαρκινογόνες ουσίες σε καρκινογόνες, η πιθανή μείωση της δράσης του από το τσάι του Κρόκου Κοζάνης μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η επανεξέταση των παραπάνω στοιχείων με επιπλέον μελέτες κρίνεται απαραίτητη.

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του τσαγιού Κρόκου Κοζάνης στη λειτουργία του CYP1A2 χρησιμοποιήθηκε η καφεΐνη ως φάρμακο-δείκτης. Σημειώνεται στη βιβλιογραφία ότι ο καταλληλότερος τρόπος για την επίτευξη του στόχου μας θα ήταν η χρησιμοποίηση ιστών στους οποίους εκφράζεται το CYP1A2, κυρίως με τη χρήση του αίματος ή κάποιου άλλου σωματικού υγρού. Συγκεκριμένα, το ένζυμο που ερευνούμε εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, και ο ακριβής ενζυμικός προσδιορισμός θα μπορούσε να επιτευχθεί με τη διαδικασία Western blot ή με ανάλυση mRNA σε δείγματα βιοψίας ήπατος (Faber *et al.*, 2005). Για λόγους ηθικής δεοντολογίας, όμως, προτιμάται η χρήση των φαρμάκων-δεικτών έναντι της λήψης βιοψίας ήπατος για την *in vivo* διερεύνηση της δράσης του CYP1A2. Κατά συνέπεια, χρησιμοποιήθηκε η καφεΐνη, μέσω της οποίας γίνεται έμμεσος, μόνον, προσδιορισμός της δραστηριότητας του CYP1A2, σε αντίθεση με τον άμεσο προσδιορισμό που επιτυγχάνεται με τη χρήση ηπατικού ιστού.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η *in vivo* επίδραση του τσαγιού Κρόκου Κοζάνης (*Crocus Sativus* L.) στη λειτουργία του ενζύμου CYP1A2, το οποίο συμμετέχει στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, η ημερήσια κατανάλωση 300mg στιγμάτων Κρόκου Κοζάνης υπό μορφή τσαγιού αναστέλλει τη λειτουργία του CYP1A2. Αντίθετα, η μεταβολική οδός της 37X δεν επηρεάστηκε από την κατανάλωση του τσαγιού Κρόκου Κοζάνης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πιθανή αναπροσαρμογή της δοσολογίας φαρμάκων που αποτελούν υποστρώματα για το CYP1A2, όταν αυτά συγχωρηγούνται με τσάι του Κρόκου Κοζάνης. Ακόμη, η μερική αναστολή που επιφέρει στο CYP1A2 το τσάι του Κρόκου Κοζάνης πιθανώς να έχει χημειοπροστατευτικό χαρακτήρα λόγω παρεμπόδισης της παραγωγής καρκινογόνων ενώσεων από περιβαλλοντικά προκαρκινογόνα. Κρίνεται, τέλος, απαραίτητη η συμμετοχή επιπλέον εθελοντών σε αντίστοιχες μελέτες για την καλύτερη κατανόηση της επίδρασης του τσαγιού Κρόκου Κοζάνης στη δραστηριότητα του CYP1A2.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abdullaev FI, Espinosa-Aguirre JJ. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detection and prevention* 2004, 28(6): 426–432.
2. Abe K, Saito H. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. *Phytotherapy Research: PTR*. 2000, 14(3):149–152.
3. Adedoyin A, Stiff DD, Smith DC, Romkes M, Bahnson RC, Day R, Hofacker J, Branch RA, Trump DL. All-trans-retinoic acid modulation of drug-metabolizing enzyme activities: investigation with selective metabolic drug probes. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1998, 41(2): 133-139.
4. Alonso G, Salinas MR, Garijo J, Sanchez-Fernandez MA. Composition of crocins and picrocrocin from Spanish saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Food Quality* 2007, 24(3), 219-233.
5. Amin B, Abnous K, Motamedshariaty V, Hosseinzadeh H. Attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis by ethanolic and aqueous extracts of *Crocus sativus* L. stigma after chronic constriction injury of rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 2014, 86(4): 1821-1832.
6. Arnaud MJ. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2011, (200): 33-91
7. Bathaie SZ, Mousavi SZ. New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2010, 50(8): 761-786.
8. Begas E, Kouvaras E, Tsakalof A, Bounitsi M, Asproдини EK. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for CYP1A2 phenotyping by use of a caffeine metabolite ratio in saliva. *Biomedical Chromatography* 2015, 29(11), 1657-1662.
9. Begas E, Kouvaras E, Tsakalof A, Papakosta S, Asproдини EK. In vivo evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthine oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios. *Biomedical Chromatography* 2007, 21(2): 190-200.
10. Berger F, Hensel A, Nieber K. Saffron extract and trans-crocetin inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat cortical brain slices. *Neuroscience* 2011, 180: 238-247.
11. Bitanhiirwe BK, Woo TU. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2011, 35(3): 878-893.

12. Boskabady MH, Tabatabaee A, Byrami G. (2012). The effect of the extract of *Crocus sativus* and its constituent safranal, on lung pathology and lung inflammation of ovalbumin sensitized guinea-pigs. *Phytomedicine*, 19(10): 904-11.
13. Browning SL, Tarekegn A, Bekele E, Bradman N, Thomas MG. CYP1A2 is more variable than previously thought: a genomic biography of the gene behind the human drug-metabolizing enzyme. *Pharmacogenetics and Genomics* 2010, 20(11): 647-664.
14. Campbell ME, Spielberg SP, Kalow W. A urinary metabolite ratio that reflects systemic caffeine clearance *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1987, 42(2): 157-165.
15. Carrillo JA, Benitez J. Clinically significant pharmacokinetic interactions between dietary caffeine and medications. *Clinical Pharmacokinetics* 2000, 39(2): 127-153.
16. Carver LA, Bradfield CA. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 1997, 272(17): 11452-11456.
17. Chatterjee S, Poduval TB, Tilak JC, Devasagayam TP. A modified, economic, sensitive method for measuring total antioxidant capacities of human plasma and natural compounds using Indian saffron (*Crocus sativus*). *Clinica Chimica Acta; international journal of clinical chemistry* 2005, 352(1-2): 155–163.
18. Chryssanthi DG, Dedes P, Lamari FN, Karamanos N, Cordopatis P. Crocetin alters the gene expression pattern of metalloproteinases and theirinhibitors in breast cancer cells MDA-MB-231. *Planta Medica* 2008, 77(2): 146–151.
19. Chryssanthi DG, Lamari FN, Georgakopoulos C, Cordopatis P. A new validated SPE-HPLC method for monitoring crocetin in human plasma—Application after saffron tea consumption 2011, 55(3), 563-568.
20. clinical uses. *Wien Medizinische Wochenschrift (1946)* 2007, 157(13-14): 315-319.
21. de Oliveira L, Spiazzi CM, Bortolin T, Canevar L, Petronilho F, Mina FG, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Zugno AI. Different sub-anesthetic doses of ketamine increase oxidative stress in the brain of rats. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2009, 33(6):1003-1008.
22. di Gesso JL, Kerr JS, Zhang Q, Raheem S, Yalamanchili SK, O'Hagan D, Kay CD, O'Connell MA. Flavonoid metabolites reduce tumor necrosis factor- α secretion to a greater extent than their precursor compounds in human THP-1 monocytes. *Molecular Nutrition and Food Research* 2015, 59(6): 1143-1154.

23. Dovrtělová G, Nosková K, Juřica J, Turjap M, Zendulka O. Can bioactive compounds of *Crocus sativus* L. influence the metabolic activity of selected CYP enzymes in the rat? *Physiological Research* 2015, 64 Suppl 4: 453-458.
24. el Daly ES. Protective effect of cysteine and vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. *Journal de Pharmacie de Belgique* 1998, 53(2): 87-93.
25. Evans WC. *Trease and Evans-Pharmacognosy*. China: Saunders© Elsevier Limited; 1996. p. 438.
26. Faber MS, Jetter A, Fuhr U. Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 2005, 97(3): 125-134.
27. Fatehi M, Rashidabady T, Fatehi-Hassanabad Z. Effects of *Crocus sativus* petals' extract on rat blood pressure and on response induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum. *Journal of Ethnopharmacology* 2003, 84(2-3): 199–203.
28. Festuccia C, Mancini A, Gravina GL, Scarsella L, Llorens S, Alonso GL, Tatone C, Di Cesare E, Jannini EA, Lenzi A, D'Alessandro AM, Carmona M. Antitumor effects of saffron-derived carotenoids in prostate cancer cell models. *Biomed Research International* 2014, 2014: 135048.
29. Frusciante S, Diretto G, Bruno M, Ferrante P, Pietrella M, Prado-Cabrero A, Rubio-Moraga A, Beyer P, Gomez-Gomez L, Al-Babili S, Giuliano G. Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2014;111(33):12246-12251.
30. Fuhr U, Klittich K, Staib AH. Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1993, 35(4), 431-436.
31. Fuhr U, Kummert AL. The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions?. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1995, 58(4): 365-373.
32. Fuhr U, Rost KL. Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. *Pharmacogenetics* 1994, 4(3): 109-116.
33. Georgiadou, G, Grivas V, Tarantilis P.A, Pitsikas N. Crocins the active constituents of *Crocus sativus* L, counteracted ketamine-induced behavioural deficits in rats. *Psychopharmacology* 2014, 231(4), 717–726.
34. Ghadrdoost B, Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Hajisoltani R, Bandegi AR, Motamedi F, Haghighi S, Sameni HR, Pahlvan S. Protective effects of saffron extract and its active constituent

crocins against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. *European Journal of Pharmacology* 2011, 667(1-3), 222-229.

35. Goyal SN, Arora S, Sharma AK et al. Preventive effect of crocin of *Crocus sativus* on hemodynamic, biochemical, histopathological and ultrastructural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. *Phytomedicine* 2011, 17: 227-232.

36. Grant DM, Tang BK, Campbell ME, Kalow W. Effect of allopurinol on caffeine disposition in man. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1986, 21(4), 454-458.

37. Gu L, Gonzalez FJ, Kalow W, Tang BK. Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline by cDNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics* 1992, 2(2): 73-77.

38. Gunes A, Dahl ML. Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics* 2008, 9(5): 625-637.

39. Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Carrier J, Khan IA, Edwards DJ, Shah A. In vivo assessment of botanical supplementation on human cytochrome P450 phenotypes: *Citrus aurantium*, *Echinacea purpurea*, milk thistle, and saw palmetto. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2004, 76(5): 428-440.

40. Gurley BJ, Swain A, Hubbard MA, Williams DK, Barone G, Hartsfield F, Tong Y, Carrier DJ, Cheboyina S, Battu SK. Clinical assessment of CYP2D6-mediated herb-drug interactions in humans: effects of milk thistle, black cohosh, goldenseal, kava kava, St. John's wort, and *Echinacea*. *Molecular Nutrition and Food Research* 2008, 52(7): 755-763.

41. Halataei BA, Khosravi M, Arbabian S, Sahraei H, Golmanesh L, Zardooz H, Jalili C, Ghoshoni H. Saffron (*Crocus sativus*) aqueous extract and its constituent crocin reduces stress-induced anorexia in mice. *Phytotherapy Research : PTR*. 2011, 25(12):1833-1838.

42. Han XM, Ouyang DS, Chen XP, Shu Y, Jiang CH, Tan ZR, Zhou HH. Inducibility of CYP1A2 by omeprazole in vivo related to the genetic polymorphism of CYP1A2. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2002, 54(5), 540-543.

43. Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell, *Molecular Cell Biology*, 4th edition, New York, W. H. Freeman, 2000, 12.3.

44. Harvey R, Champe P, *Φαρμακολογία*, 3^η έκδοση, Αθήνα, Ι. Στ. Παπαδόπουλος, 2007, 123-124.

45. Hassan MH, Bahashawan SA, Abdelghany TM, Abd-Allah GM, Ghobara MM. Crocin Abrogates Carbon Tetrachloride-Induced Renal Toxicity in Rats via Modulation of

Metabolizing Enzymes and Diminution of Oxidative Stress, Apoptosis, and Inflammatory Cytokines. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2015, 29(7): 330-339.

46. He K, Si P, Wang H, Tahir U, Chen K, Xiao J, Duan X, Huang R, Xiang G. Crocetin induces apoptosis of BGC-823 human gastric cancer cells. *Molecular Medicine Reports* 2014, 9(2): 521-526.
47. Hosseini A, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Pharmacokinetic Properties of Saffron and its Active Components. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2018, 43(4): 383-390.
48. Hosseinzadeh H, Ghenaati J. Evaluation of the antitussive effect of stigma and petals of saffron(*Crocus sativus*)and its components, safranal and crocin in guinea pigs. *Fitoterapia*. 2006, 77(6): 446–448.
49. Hosseinzadeh H, Jahanian Z. Effect of *Crocus sativus* L. (saffron) stigma and its constituents, crocin and safranal, on morphine withdrawal syndrome in mice. *Phytotherapy Research PTR*. 2010, 24(5):726-730.
50. Hosseinzadeh H, Khosravan V. Anticonvulsant effects of aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus* L. stigmas in mice. *Archives of Iranian Medicine* 2002, 5(1): 44–47.
51. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Rahimi A. Effect of safranal on extracellular hippocampal levels of glutamate and aspartate during kainic Acid treatment in anesthetized rats. *Planta Medica* 2008, 74(12):1441-1445.
52. Hosseinzadeh H, Talebzadeh F. Anticonvulsant evaluation of safranal and crocin from *Crocus sativus* in mice. *Fitoterapia*. 2005, 76(7-8): 722–724.
53. Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacology* 2002, 15(2): 7.
54. Hosseinzadeh H, Ziaee T, Sadeghi A. The effect of saffron, *Crocus sativus* stigma extract and its constituents, safranal and crocin on sexual behaviors in normal male rats. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 2008, 15(6-7):491–495.
55. Iyengar S, Mick S, Dilworth V, Michel J, Rao TS, Farah JM, Wood PL. Sigma receptors modulate the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis centrally: evidence for a functional interaction with NMDA receptors, in vivo. *Neuropharmacology*. 1990, 29(3): 299-303.
56. Jeong HG, Chun YJ, Yun CH, Moon CK, Lee HS, Han SS, Lee ES, Jeong TC. Induction of cytochrome P450 1A and 2B by alpha- and beta-ionone in Sprague Dawley rats. *Archives of Pharmacal Research* 2002, 25(2): 197-201.

57. Jewell C, O'Brien NM. Effect of dietary supplementation with carotenoids on xenobiotic metabolizing enzymes in the liver, lung, kidney and small intestine of the rat. *The British Journal of Nutrition* 1999, 81(3):235-242.
58. Jiang Z, Dragin N, Jorge-Nebert LF, Martin MV, Guengerich FP, Aklillu E, Ingelman-Sundberg M, Hammons GJ, Lyn-Cook BD, Kadlubar FF, Saldana SN, Sorter M, Vinks AA, Nassr N, von Richter O, Jin L, Nebert DW. Search for an association between the human CYP1A2 genotype and CYP1A2 metabolic phenotype. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2006, 16(5): 359-367.
59. Jin YY, Zhang JS, Zhang Y, Zhang YH. Studies on the intestinal absorption of crocin in rats and determination of the partition coefficient. *Journal of China Pharmaceutical University* 2004, 35: 283–284.
60. Kalow W, Tang BK. The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1993, 53(5): 503-514.
61. Kot M, Daniel WA. The relative contribution of human cytochrome P450 isoforms to the four caffeine oxidation pathways: an in vitro comparative study with cDNA-expressed P450s including CYP2C isoforms. *Biochemical Pharmacology* 2008, 76(4): 543-551.
62. Koul A, Abraham SK. Efficacy of crocin and safranal as protective agents against genotoxic stress induced by gamma radiation, urethane and procarbazine in mice. *Human and Experimental Toxicology* 2018, 37(1): 13-20.
63. Kyriakoudi A, Ordoudi S, Roldan-Medina M, Tsimidou M. Saffron, A Functional Spice. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences* 2015, 3(1), 1-3.
64. Lage M, Cantrell C. Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions. *Scientia Horticulturae* 2009, 121: 366–373.
65. Lampe JW, King IB, Li S, Grate MT, Barale KV, Chen C, Feng Z, Potter JD. Brassica vegetables increase and apiaceous vegetables decrease cytochrome P450 1A2 activity in humans: changes in caffeine metabolite ratios in response to controlled vegetable diets. *Carcinogenesis* 2000, 21(6): 1157-1162.
66. Landi MT, Sinha R, Lang NP, Kadlubar FF. Human cytochrome P4501A2. *IARC Scientific Publications* 1999, (148):173-195.
67. Lang NP, Butler MA, Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Hauer-Jensen M, Kadlubar FF. Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 1994, 3(8): 675-682.

68. Le Marchand L, Franke AA, Custer L, Wilkens LR, Cooney RV. Lifestyle and nutritional correlates of cytochrome CYP1A2 activity: inverse associations with plasma lutein and alpha-tocopherol. *Pharmacogenetics* 1997, 7(1): 11-19.
69. Lechtenberg M, Schepmann D, Niehues M, Hellenbrand N, Wünsch B, Hensel A. Quality and functionality of saffron: quality control, species assortment and affinity of extract and isolated saffron compounds to NMDA and sigma1 (sigma-1) receptors. *Planta Medica*. 2008, 74(7): 764-772.
70. Lelo A, Kjellen G, Birkett DJ, Miners JO. Paraxanthine metabolism in humans: determination of metabolic partial clearances and effects of allopurinol and cimetidine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1989, 248(1): 315-319.
71. Liakopoulou-Kyriakides M, Kyriakides DA. *Crocus sativus*-Biological active Constituents. *Studies in Natural Products Chemistry* 2002, 26(Part G): 293–312.
72. Lin JH, Lu AY. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics* 1998, 35(5): 361-390.
73. Liu DD, Ye YL, Zhang J, Xu JN, Qian XD, Zhang Q. Distinct pro-apoptotic properties of Zhejiang saffron against human lung cancer via a caspase-8-9-3 cascade. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014, 15(15): 6075-6080.
74. Mahboobeh A, Zahra Bathaie S, Saeid A, Mahshid A. Effect of Crocin on Cell Cycle Regulators in N-Nitroso-N-Methylurea-Induced Breast Cancer in Rats. *DNA and Cell Biology* 2015, 34(11): 684-691.
75. Maliakal PP, Wanwimolruk S. Effect of herbal teas on hepatic drug metabolizing enzymes in rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2001, 53(10): 1323-1329.
76. Marín L, Miguélez, EM, Villar CJ, Lombó F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed Research International* 2015, 905215.
77. Martin G, Goh E, Neff A. Evaluation of the developmental toxicity of crocetin on *Xenopus*. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2002;40(7): 959–964.
78. McLean A, Driver E, Combined effects of low doses of DDT and phenobarbital on cytochrome P450 and amidopyrine demethylation. *Biochemical Pharmacology* 1977, 26(14): 1299-1302.
79. Melnyk JP, Wang S, Marcone MF. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food Research International* 2010,43(8):1981–1989.

80. Melva Louisa, Frans D. Suyatna, Arini Setiawati, Sri W.A. Jusman. The effect of lycopene on the total cytochrome P450, CYP1A2 and CYP2E1. *Medical Journal of Indonesia* 2009, 18(4), 233-238.
81. Miller DB, O'Callaghan JP. Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism* 2002, 51(6 Suppl 1): 5-10.
82. Mostafavinia SE, Khorashadizadeh M, Hoshyar R. Antiproliferative and Proapoptotic Effects of Crocin Combined with Hyperthermia on Human Breast Cancer Cells. *DNA and Cell Biology* 2016, 35(7): 340-347.
83. Naghshineh A, Dadras A, Ghalandari B, Riazi GH, Modaresi SM, Afrasiabi A, Aslani MK. Safranal as a novel anti-tubulin binding agent with potential use in cancer therapy: An in vitro study. *Chemico-biological Interactions* 2015, 238: 151-60.
84. Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Kinoshita M, Funayama M, Kamataki T. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *Journal of Biochemistry* 1999, 125(4): 803-808.
85. Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Shin S, Kadlubar FF, Kamataki T. Phenotyping of CYP1A2 in Japanese population by analysis of caffeine urinary metabolites: absence of mutation prescribing the phenotype in the CYP1A2 gene. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 1994, 3(5): 413-421.
86. Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* 2004, 14(1): 1-18.
87. Nemati H BM, Ahmadzadeh Vostakolaei H. Stimulatory effect of crocus sativus (saffron) on beta2-adrenoceptors of guinea pig tracheal chains. *Phytomedicine* 2008, 15(12): 1038–1045.
88. Notarianni LJ, Oliver SE, Dobrocky P, Bennett PN, Silverman BW. Caffeine as a metabolic probe: a comparison of the metabolic ratios used to assess CYP1A2 activity. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1995, 39(1), 65-69.
89. Nouredini SK, Wink M. Antiproliferative effects of crocin in HepG2 cells by telomerase inhibition and hTERT down-regulation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 2012, 13(5): 2305-2309.
90. Ogu CC, Pharm D, Maxa JL. Drug interactions due to cytochrome P450. *Baylor University Medical Center Proceedings* 2000, 13(4), 421-423.

91. Olson J, Κλινική Φαρμακολογία Διασκεδαστικά Απλή, Ηράκλειο, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997, 7.
92. Paolini M, Antelli A, Pozzetti L, Spetlova D, Perocco P, Valgimigli L, Pedulli GF, Cantelli-Forti G. Induction of cytochrome P450 enzymes and over-generation of oxygen radicals in beta-carotene supplemented rats. *Carcinogenesis* 2001, 22(9): 1483-1495.
93. Papandreou MA, Tsachaki M, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Lamari FN, Margarity M. Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. *Behavioural Brain Research* 2011, 219(2): 197-204.
94. Pitsikas N. Constituents of Saffron (*Crocus sativus* L.) as Potential Candidates for the Treatment of Anxiety Disorders and Schizophrenia, *Molecules* 2016, 21(3), 303
95. Polasek TM, Lin FP, Miners JO, Doogue MP. Perpetrators of pharmacokinetic drug-drug interactions arising from altered cytochrome P450 activity: a criteria-based assessment. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2011, 71(5): 730-733.
96. Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metabolism Reviews* 2002, 34(1-2): 83-448.
97. Rios J, Recio M, Giner R, Manez S. An update review of saffron and its active constituents. *Phytotherapy Research*. 1996, 10(3): 189–193.
98. Sachse C, Bhambra U, Smith G, Lightfoot TJ, Barrett JH, Scollay J, Garner RC, Boobis AR, Wolf CR, Gooderham NJ; Colorectal Cancer Study Group. Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2003, 55(1):68-76.
99. Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. Functional significance of a C-->A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1999, 47(4): 445-449.
100. Samarghandian S, Borji A, Farahmand SK, Afshari R, Davoodi S. *Crocus sativus* L. (saffron) stigma aqueous extract induces apoptosis in alveolar human lung cancer cells through caspase-dependent pathways activation. *Biomed Research International* 2013, 2013: 417928.
101. Samarghandian S, Borji A. Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus* L.) and its ingredients. *Pharmacognosy Research* 2014, 6(2): 99–107.
102. Samuelsson G., Φαρμακευτικά προϊόντα φυσικής προέλευσης, 2^η Έκδοση, Ηράκλειο, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2004: 289
103. Sarris J. Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: A systematic review. *Phytother research: PTR*. 2007, 21(8): 703–706.

104. Schmidt M, Betti G, Hensel A. Saffron in phytotherapy: pharmacology and
105. Shimada H, Eto M, Ohtaguro M, Ohtsubo M, Mizukami Y, Ide T, Imamura Y. Differential mechanisms for the inhibition of human cytochrome P450 1A2 by apigenin and genistein. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2010, 24(4): 230-234.
106. Sim SC, and Ingelman-Sundberg M. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Human Genomics* 2010, 4(4): 278-281.
107. Smith G, Stubbins MJ, Harries LW, Wolf CR. Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 1998, 28(12): 1129-1165.
108. Soeda S, Ochiai T, Paopong L, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced cell death of neuronally differentiated PC-12 cells. *Life Sciences* 2001, 69(24): 2887-2898.
109. Soszyński M, Bartosz G. Decrease in accessible thiols as an index of oxidative damage to membrane proteins. *Free Radical Biology and Medicine* 1997, 23(3): 463-469.
110. Tang BK, Grant DM, Kalow W. Isolation and identification of 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil as a major metabolite of caffeine in man. *Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals* 1983, 11(3): 218-220.
111. Tao L, Xiang YB, Chan KK, Wang R, Gao YT, Yu MC, Yuan JM. Cytochrome P4501A2 Phenotype and Bladder Cancer Risk: The Shanghai Bladder Cancer Study. *International Journal of Cancer* 2012, 130(5), 1174-1183.
112. Tarantilis A, Tsoupras G, Moschos P. Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1995, 699(1-2): 107-118.
113. Thachil AF, Mohan R, Bhugra D. The evidence base of complementary and alternative therapies in depression. *Journal of affective Disorders* 2007, 97(1-3): 23–35
114. Vistisen K, Loft S, Olsen JH, Vallentin S, Ottesen S, Hirsch FR, Poulsen HE. Low CYP1A2 activity associated with testicular cancer. *Carcinogenesis* 2004, 25(6): 923-929.
115. Wallis TE. Textbook of Pharmacognosy. 5η Έκδοση, New Delhi: CBS Publishers and Distributors, 2005: 163–165.
116. Wang B, Zhou SF. Synthetic and natural compounds that interact with human cytochrome P450 1A2 and implications in drug development. *Current Medicinal Chemistry* 2009, 16(31): 4066-4218.

117. Wang H, Leung LK. The carotenoid lycopene differentially regulates phase I and II enzymes in dimethylbenz[a]anthracene-induced MCF-7 cells. *Nutrition* 2010, 26(11-12): 1181-1187.
118. Weisburger JH, Dolan L, Pittman B. Inhibition of PhIP mutagenicity by caffeine, lycopene, daidzein, and genistein. *Mutation Research*. 1998, 416(1-2): 125-128.
119. Wenk M, Todesco L, Krähenbühl S. Effect of St John's wort on the activities of CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, N-acetyltransferase 2, and xanthine oxidase in healthy males and females. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2004, 57(4), 495-499.
120. Wong P, Villeneuve G, Tessier V, Banerjee K, Nedev H, Jean-Claude BJ, Leyland-Jones B. Stability of 5-acetamido-6-formylamino-3-methyluracil in buffers and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002, 28(3-4): 693-700.
121. Xiao J, Huang WH, Peng JB, Tan ZR, Ou-Yang DS, Hu DL, Zhang W, Chen Y. Quercetin significantly inhibits the metabolism of caffeine, a substrate of cytochrome P450 1A2 unrelated to CYP1A2*1C (-2964G>A) and *1F (734C>A) gene polymorphisms. *BioMed Research International* 2014, 2014: 405071.
122. Xu GL, Li G, Ma HP, Zhong H, Liu F, Ao GZ. Preventive effect of crocin in inflamed animals and in LPS-challenged RAW 264.7 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57(18): 8325-8330.
123. Yoshinari K, Ueda R, Kusano K, Yoshimura T, Nagata K, Yamazoe Y. Omeprazole transactivates human CYP1A1 and CYP1A2 expression through the common regulatory region containing multiple xenobiotic-responsive elements. *Biochemical Pharmacology* 2008, 76(1): 139-145.
124. Yueh MF, Huang YH, Hiller A, Chen S, Nguyen N, Tukey RH. Involvement of the xenobiotic response element (XRE) in Ah receptor-mediated induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1. *The Journal of Biological Chemistry* 2003, 278(17): 15001-15006.
125. Zabela V, Sampath C, Oufir M, Moradi-Afrapoli F, Butterweck V, Hamburger M. Pharmacokinetics of dietary kaempferol and its metabolite 4-hydroxyphenylacetic acid in rats. *Fitoterapia* 2016, 115: 189-197.
126. Zarei Jaliani H, Riazi GH, Ghaffari SM, Karima O, Rahmani A. The effect of the crocus sativus L. Carotenoid, crocin, on the polymerization of microtubules, in vitro. *Iranian Journal of Basic Medical Science* 2013, 16(1): 101-107.
127. Zargari A., *Medicinal plants*, 6^η έκδοση, 3^{ος} τόμος, Tehran, Tehran University Press, 1990: 574

128. Zhang Y, Liu JX, Lin L, Li LQ. Pharmacokinetics of crocin-1 after oral administration in rats. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* 2012, 47(2): 136–140.
129. Zhou SF, Liu JP, Chowbay B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metabolism Reviews* 2009, 41(2): 89-295.
130. Zhou SF, Yang LP, Zhou ZW, Liu YH, Chan E. Insights into the substrate specificity, inhibitors, regulation, and polymorphisms and the clinical impact of human cytochrome P450 1A2. *The AAPS Journal* 2009, 11(3): 481-494.
131. Ιγνατιάδου-Ραγκούση Β., Χημεία Φυσικών Προϊόντων, 2η Έκδοση, Αθήνα, Εκδόσεις Συμμετρία, 2009: α)51 β)112-116 γ)64-76.
132. Χρυσοστομίδου Ε., Ο Κρόκος Κοζάνης και η καλλιέργειά του, Καλαμάτα, Ανώτατο Τεχνολογικό Ίδρυμα Καλαμάτας, 2012: 8-10.